

琉球大学学術リポジトリ

R 因子保有菌に対するフラジオマイシン, パンフラン
S およびフラゾリドンの効果(畜産学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 金城, 俊夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/4308

R因子保有菌に対するフラジオマイシン、パンフランSおよびフラゾリドンの効果*

金城 俊夫**

Toshio KINJO: Effect of fradiomycin, panfuran S and furazolidone on the R factors-carrying *Escherichia coli*

I 緒 言

化学療法剤は、もともと人間の感染症治療剤として開発されたが、飼料に添加することによって家畜の発育促進や病の予防、治療に効果が認められるに及んで、畜産領域でも広く利用されるようになった。

近年、畜産物の生産が急激に増加したのも、化学療法剤の広範な使用に負う処が大きい。

ところが、一方では家畜、家禽への化学療法剤の応用に伴って、これらに対する耐性菌が出現し、増加の傾向を示してきている。さらに、これら耐性菌の中には、耐性という性質を他の感受性菌に伝達しうるR因子を保有する菌が高率に存在することも明らかにされてきている。

R因子は分類学上の科や属を越えたきわめて広範囲の細菌に感染して耐性を発現させる特徴をもっている。

家畜、家禽におけるR因子保有菌の出現は畜産領域での薬剤の効果を低下させるばかりでなく、これらR因子保有菌が乳、肉、卵等の畜産物を通じて、経口的に人体へと感染あるいは伝播していき、人間の細菌性疾患の治療を困難にする可能性があり、公衆衛生上、重要な問題となっている。

このようなことから、近年畜産領域への化学療法剤、特に人間に使用されている薬剤の使用が制限あるいは禁止されつつある。

他方、実地医学的見地からR因子拡散に対する防止策が考慮され、研究されてきている。すなわち、第1はR因子の伝達阻害剤の研究、第2は耐性化した菌を感受性化する薬剤の研究、第3はR因子保有菌に特異的選択的殺菌作用を示す薬剤の研究等である。

しかし、畜産領域でこのような視点から、家畜由来R因子保有菌について研究した報告はほとんど見当たらない。

そこで今回、著者は最近畜産領域で治療薬あるいは飼料添加剤として使用されている、フラジオマイシンとニトロフラン系のパンフランSおよびフラゾリドンについて、著者が分離した家畜糞便由来耐性大腸菌を用い、R因子の除去作用あるいは選択的増殖阻止作用があるか否かを検討した。

* 本論文の要旨は第80回日本獣医学会（昭和50年10月5日、大阪）において発表した。

** 琉球大学農学部畜産学科

琉球大学農学部学術報告 23: 303~311 (1976)

II 実験材料および方法

1. 薬剤耐性試験およびR因子検査法

耐性試験に使用した化学療法剤はAB-PC, SM, TC, CP, KMおよびSAの6剤で, 耐性限界濃度および試験法等は既報^{7,9)}の通りである。

R因子の検査法も常法⁶⁾に従い, 受容菌としてはNA耐性の大腸菌K-12, ML1410株を使用した。なお, 本実験で使用する被検菌株はすべて健康家畜の糞便由来の大腸菌である。

2. R因子除去に使用した薬剤

フラジオマイシン(FM)とニトロフラン系のパンフランS(PFS)(=dihydroxymethyl furatri-zine)およびフラゾリドン(FZ)を用いた。なお, 対照の意味で, 既にR因子除去作用が認められているアクリフラビン(AF)およびSDS(=sodium dodecyl sulfate)も使用した。

3. R因子除去法

R因子保有(R⁺)大腸菌をハートインフュージョンブイヨン(HIB)に37°C, 18時間培養後, その0.1 mlを, あらかじめ被検菌毎に調べておいた各薬剤の sublethal の濃度に含む HIB 10 ml に接種し, よく攪拌後さらに37°Cで18時間培養した。

これをハートインフュージョン寒天(HIA)上にそれぞれ培養して孤立集落を形成させた。できた集落から無作為的に25~150箇菌し, それぞれ2 mlの滅菌生食に浮遊した。

これらを, それぞれのR因子耐性型と同じ薬剤を耐性限界濃度(SAは200 μg/ml, 他の5剤は何れも25 μg/ml)に含むHIA培地にスポット培養した。

このように培養後, 発育がみられない場合, 再度確認した上で, R因子が除去されたものとして判定した。

なお, 使用した各薬剤の sublethal 濃度は, FM 0.6~5, PFS 0.6~1.0, FZ 1.25~20, AF 5~20 μg/ml で, SDS は明瞭な限界濃度が得られず, 便宜上 0.32~50 mg/ml を使用した。

4. 使用菌株

R因子除去に使用したR⁺菌株は, 鶏由来7, 豚由来1, 牛および山羊由来各2の計12株である。これらR⁺菌のR耐性型は成績の項で示す。

なお, R⁺菌がR⁻菌に比し, ある種の薬剤に対する感受性が高まるか否かを検討するために, 表1に示すような各家畜由来のR⁺菌108株, R⁻菌193株さらに対照として, 検査した6薬剤すべてに感受性を示した菌(S菌)193株の計494株を供試した。

Table 1. *E. coli* strains used for epistatic sensitivity test

Origin	R ⁺	R ⁻	S	Total
Chicken	72	85	50	207
Pig	19	77	115	211
Cattle	7	9	9	25
Goat	4	12	9	25
Horse	6	10	10	26
Total	108	193	193	494

R⁺, R⁻: R factors positive or negative

S: Sensitive to AB-PC, SM, TC, CP, KM and SA

Ⅲ 実験成績

1. FM, PFSおよびFZによるR因子の除去

表3に示すような、各種R因子耐性型を示す計12株について、FM, PFSおよびFZによるR因子の除去を試みた。なお、比較の意味でR因子の除去作用が認められているAFおよびSDSも用い、また対照として、R因子の自然喪失の率をみるため、これら薬剤の代り生食を用いた系も設定した。

総計延べ4,310箇の集落について検査したが、それぞれの薬剤の除去効果は表3に示す通りで、何れの薬剤でもきわめて低率ながらその効果がみられた。

AFで最も高率で2.92(755被検集落中22集落)にR因子のすべての耐性型あるいは一部の耐性型の除去が認められた。

次いでSDSの1.27%(710中9集落)が高く、今回特に選んで使用した3剤では、FZが0.98%(720中7集落)、FMが0.80%(755中6集落)およびPFSが0.75%(670中5集落)の順であった。なお、薬剤無添加の対照でも0.15%(700中1集落)にR因子の自然喪失がみられた。

使用した12株中9株にR因子の除去が認められ、菌株によって差がある。

自然喪失のみられたChicken 38株のRはSM-TC-SAの3剤耐性型であるが、すべての薬剤によって比較的高率に除去されており、しかも3剤耐性型そのまま除去される場合が多い。さらに2剤耐性型あるいは1剤耐性型のみ除去される場合をみると、対照を含め何れの場合でもTCは除去されている。このことから該菌においてはR因子が比較的不安定な形で存在しているが、特にTC耐性型が不安定であるといえる。

Chicken 102株においてはR耐性型がSM-TC-SAの3剤型であるが、R因子の除去はすべて1剤ずつ解離した状態になっている。これに対し、Chicken 59株ではSM-TCの2剤型であるが、何れの場合もそのまま2剤が同時に除去されている。

R因子の除去が全くみられなかった3株はChicken 42の4剤耐性型、Chicken 29の2剤型およびCattle 14の2剤型で、除去の難易が単剤型あるいは多剤型によって差があるような成績は特に得られてない。

2. FM, PFSおよびFZのR⁺菌に対する作用

耐性菌がR⁺菌になることによって、ある種の薬剤に高感受性(epistatic sensitivity)になることが知られているが、家畜由来R⁺菌に対しFM, PFS, FZがこのような作用を示すか否かを検討した。

この実験に、表1に示したような、R⁺菌108株、R⁻菌193株、さらに6剤に感受性のS菌193株も対照として加えて、計494株を使用した。

Table 2. Comparison of average minimum inhibitory concentration (MIC) of FM, PFS and FZ for 3 groups of *E. coli*

Number of strains tested		FM	PFS	FZ	Average
R ⁺	108	3.00*	3.17	14.50	6.89
R ⁻	193	3.68	2.52	13.50	6.57
S	193	1.65	0.95	3.58	2.06
Total	494	2.78	2.21	10.53	5.17

* $\mu\text{g/ml}$

FMとPFSは $20\mu\text{g}/\text{ml}$ より、FZは $40\mu\text{g}/\text{ml}$ よりそれぞれ2倍段階希釈寒天平板を6段階準備し、これに各菌を培養して、それぞれの最小発育阻止濃度(MIC)を求めた。

各MICの百分率を求め、これらを薬剤毎および菌群毎にまとめ図1に示した。さらに、各菌毎の平均MICを求め、その成績を表2に示した。

図1および表2から明らかな如く、 R^+ 菌と R^- 菌の間に、3薬剤に対するMICの分布のパターンに大差なく、また平均MICにも有意の差が認められてない。

このことから、これら3薬剤が、 R^+ 菌に特異的に作用するという現象は確認されなかった。

一方、S菌についてみると、何れの薬剤とも R^+ および R^- 菌より、その平均MICが小さく有意の差があり、これら3薬剤も他の化学療法剤に感受性の高い菌程有効なことが示された。

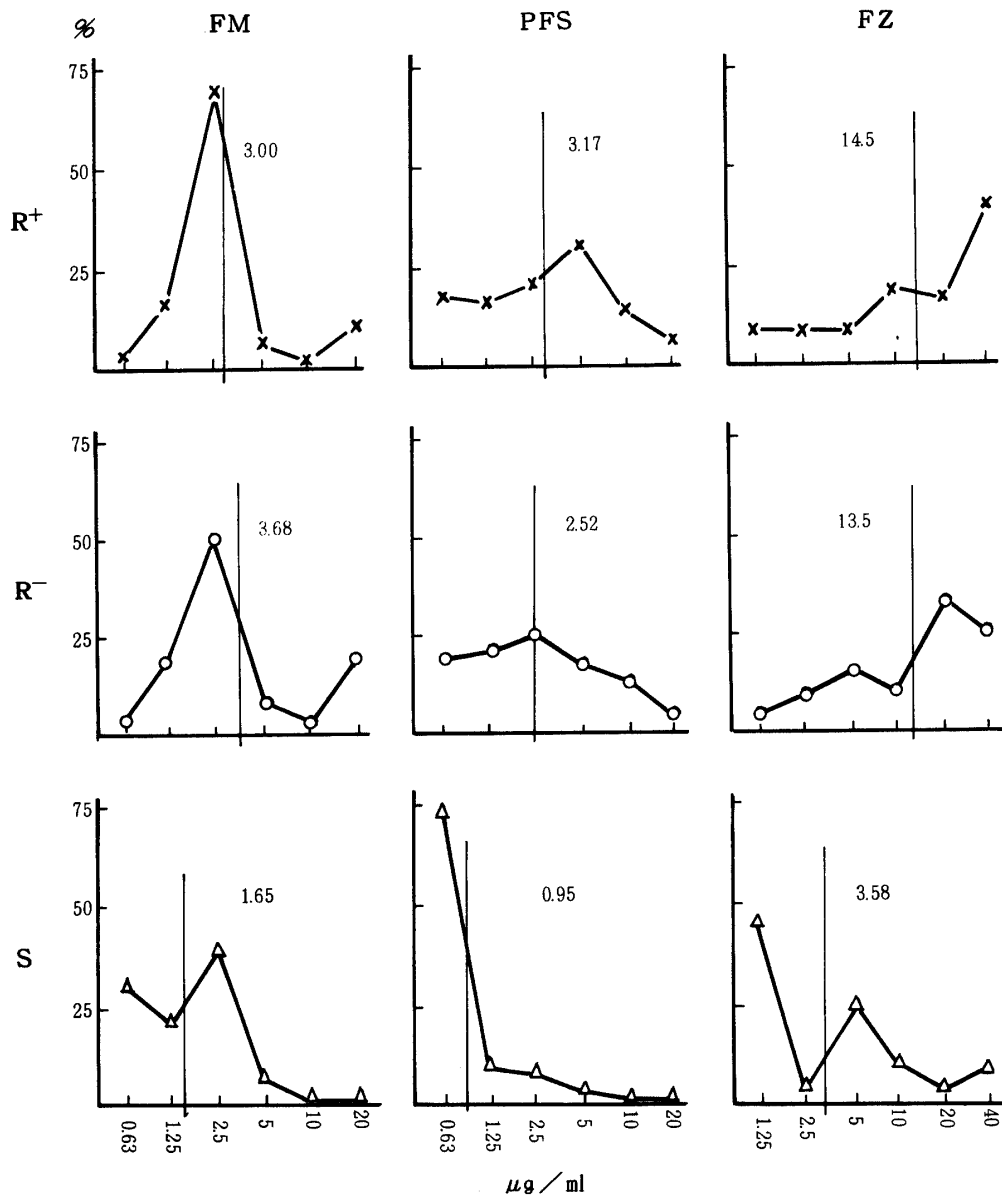


Figure 1. Distribution of MIC of FM, PFS and FZ for 3 groups of *E. coli*

Table 3. Elimination of R factors of *E. coli* by treatment with drugs

Strains used	Resistance pattern of R	FM	PFS	FZ	AF	SDS	Cont
C 42* ¹	AB.PC-SM-TC-SA	0/50* ²	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50
C 51	SM-TC-SA	0/150	1/150 (SM)* ³	1/150 (TC)	1/150 (SM-TC-SA)	0/150	0/150
C 38	SM-TC-SA	3/50 (SM-TC-SA)	1/50 (TC-SA)	3/50 (SM-TC-SA)	5/50 (SM-TC-SA:4) (TC:5)	4/50 (SM-TC-SA:2) (TC-SA:2)	1/50 (TC)
C 102	SM-TC-SA	0/100	2/100 (TC)	1/100 (SM)	6/100 (TC:5) (SA:1)	1/100 (TC)	0/100
C 29	SM-TC	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25	0/25
C 59	SM-TC	2/70 (SM-TC)	0/70	0/70	4/60 (SM-TC)	1/70 (SM-TC)	0/70
C 7	TC	0/50	2/50 (TC)	0/50	3/50 (TC)	1/30 (TC)	0/30
P 255	SM-TC-KM-SA	0/60	0/50	0/50	0/70	2/60 (TC)	0/50
Ca 14	SM-TC	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50	0/50
Ca 3	SM-TC	0/50	-	0/50	1/50 (SM-TC)	0/50	0/50
G 256	AB.PC-SM	0/50	0/25	1/25 (SM)	2/50 (AB.PC-SM)	0/25	0/25
G 22	SM	1/50 (SM)	0/50	1/50 (SM)	0/50	0/50	0/50
Total	4,310	6/755 0.80%	5/670 0.75	7/720 0.98	22/755 2.92	9/710 1.27	1/700 0.15

*¹ C: chicken, P: pig, Ca: cattle, G: goat

*² Number of the drug-sensitive colonies / number of total colonies tested

*³ (SM) means R factor for SM was eliminated by treatment with the drug indicated.

IV 考 察

家畜由来の腸内細菌のR因子をこれ以上蔓延させないことは公衆衛生上も重要なことである。

R因子の拡散防止策として既述の如く、第1はR因子の伝達阻害剤の研究^{1,9)}、第2はR因子を除去する薬剤の研究、第3はR⁺菌に特異的に作用する薬剤の研究等が行なわれている。

R因子の除去物質として、Mitsubishiら^{10,11)}、Watanabe and Fukasawa¹⁹⁾はアクリジン系色素が低率ながら有効であることを認めている。また、桶谷¹⁴⁾はニトロフラン誘導体(PFS)に、Tomoedaら¹⁸⁾、Inuzukaら⁴⁾はSDSに、Bouanchaudら²⁾、Hahn and Ciak³⁾はethidium bromideにそれぞれR因子除去効果のあることを示した。

一方、R⁺菌に強く作用する薬剤として、アクリジン系色素およびナリジキシン酸が知られている¹³⁾。Ijobeら⁵⁾は家畜専用のマカルボマイシンが、渡辺ら²⁰⁾、斉藤ら¹⁵⁾も同様家畜飼料用に開発されたフラボマイシン(メノマイシン)がR⁺菌に特異的に作用することを認めている。その他、菅原ら¹⁶⁾はリファンピシンに同効果のあることを報告している。

今回、著者は上記の成績を考慮した上で、既存の家畜用薬剤の中で、その効果の期待できるFM、PFS、FZを選んで検討を加えた。

まず、R因子除去効果については、FZ、FM、PFSの順にきわめて低率(0.98~0.75%)ながら認められたが、これは対照として用いたAFの価(2.92%)の約1/3以下である。

Mitsubishiら¹⁰⁾はR⁺大腸菌について、AFで0.9~2.9%の除去効果を認めており、この成績は今回のAFのそれとほぼ類似している。しかしTodorovら¹⁷⁾はアクリジン系色素で10~20%、Watanabe and Fukasawa¹⁹⁾はAFで4.1%、アクリジンオレンジで2.0%にそれぞれ除去効果を認め、使用するR⁺菌の株によってその成績も異なっている。菌種についてみても、前記のMitsubishiら¹⁰⁾によると、大腸菌で0.9~2.9%の低率であったが、赤痢菌では36.2~46.6%のきわめて高率に除去されることを報告している。

このような菌種あるいは菌株の差は、R因子の菌体内での安定性と関連していることがわかる。すなわち、R因子の自然喪失率の高い菌程より高率に除去される。このことは今回の実験成績からも示されている。

R因子除去の実用面から考察すると、使用したFM、PFS、FZの3薬剤共に非常に単純な系である*in vitro*でも、上記の如く低率であることから、より複雑な*in vivo*の系で、その効果を期待することは甚だ困難であるといえよう。

次に、R⁻菌がR⁺菌に変ることによってある種の薬剤に対し高感受性(epistatic sensitivity)になることが知られていることから、3薬剤についてこの面からの検討を試みた。

使用した菌株は何れも著者が健康家畜、家禽の糞便より分離した大腸菌であるが、R⁺、R⁻菌の他に、耐性試験に使用したAB-PC等6剤すべてに感受性のS菌も対照の意味で使用した。

予期に反し、MICの分布からみると、R⁺、R⁻菌の間にFM、PFS、FZ感受性に差はなかった。これに対して、S菌の場合はMICの分布が低濃度に移行し、明らかにR⁺、R⁻菌より高感受性であることを示している。

このような成績から、3薬剤がR⁺菌に対し特異的選択的に作用するとはいえない。むしろ他の薬剤に耐性化することと併行して、感受性が低下する傾向にある。しかし、他の薬剤程耐性化は進んでないといえる。

中谷ら¹²⁾はヒト腸内細菌叢に対するPFSの影響を調べ、PFS耐性菌は少なく、またPFS耐性型を含むR因子は極めて稀であると述べている。PFS耐性菌の少ない原因が該薬剤の使用頻度の少ないことによるのか、あるいはもともと耐性化しにくいことによるのか明らかでないが、別の面から興味ある研

究課題と思われる。

今回の実験では、既に R⁺ 菌に特異的に作用するといわれている薬剤を対照として使用してないため、他との直接的比較が容易でないが、薬剤の作用をより適格に把握するためにはMICの分布を比較するより、増殖曲線を比較する方法がいいように思われる。この面から今後さらに検討を加えたい。

本実験の目的であるR因子除去ないし R⁺ 菌に特異的に作用する薬剤をFM, PFS, FZに求めることはできなかったが、家畜由来大腸菌に比較的高い抗菌作用を有し、耐性菌が少ないことを知り得た。

V 要 約

フラジオマイシン (FM), パンフランS (PFS), フラゾリドン (FZ) の3薬剤を用い、R⁺ 大腸菌に対するR因子の除去効果および特異的殺菌効果があるか否かを検討し、次の結果を得た。

1. 各家畜糞便由来R⁺菌12株を用い、延べ4,310箇の集落について、FM, PFS, FZのR因子除去効果を調べたところ、その効果は何れも低く、それぞれ0.80, 0.75, 0.98%で、これらの値はアクリフラビンのその約1/3以下であった。

2. 3薬剤がR⁺菌に特異的に作用するか否かを、R⁺菌108株、R⁻菌193株についてMICの分布を指標に比較したところ、全く差なく、何れの菌群にも同程度の抗菌作用を示した。ただし、対照の意味で用いたAB-PC等6剤に感受性のS菌193株については、極めて高い感受性を示した。

3. 今回使用したFM, PFS, FZの3薬剤共、特に実用面から家畜由来大腸菌のR因子除去剤あるいはR⁺菌に特異的に作用する薬剤としての有効性は認められなかった。しかし、これら薬剤は家畜由来大腸菌に比較的高い抗菌作用を示した。

文 献

1. Arai, T. & Watanabe, T. 1967 Effect of acriflavin on the transfer of episomes and bacterial chromosomes in *Escherichia coli* K-12, Genet. Res. Camb., 10 : 241~249
2. Bouanchaud, D. H., Scavizzi, M. R. & Chabbert, Y. A. 1969 Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and Staphylococci, J. gen. Microbiol., 54 : 417~420
3. Hahn, F. E. & Ciak, J. 1971 Elimination of bacterial episomes by DNA-complexing compounds, Ann. N. Y. Acad. Sci., 182 : 295~304
4. Inuzuka, N., Nakamura, S., Inuzuka, M. & Tomoeda, M. 1969 Specific action of sodium dodecyl sulfate on the sex-factor of *Escherichia coli* K-12 Hfr strains, J. Bact., 100 : 827~835
5. Ijobe, S., Mitsunashi, S. & Umezawa, H. 1971 Relationship between sex-pili formation and Macarboxymycin sensitivity in *Escherichia coli*, J. Bact., 108 : 946~947
6. 家畜の耐性菌研究会 1973 家畜由来の細菌に対する薬剤の最小発育阻止濃度測定法
7. Kinjo, T. 1974 Drug resistant strains of bacteria isolated from domestic animals in Okinawa II. Distribution of R factors in fecal *E. coli* strains isolated from pigs and chickens, Sci. Bull. Coll. Agr. Univ. Ryukyus, 21 : 389~402
8. ———, Nakachi, H. & Akamine, Y. 1975 ———, III. Drug resistance and distribution of R factors among fecal *E. coli* strains isolated from cattle, goats and horses, Ibid., 22 : 331~342

9. Mitsuhashi, S., Egawa, R. & Hashimoto, H. 1966 Inhibition of conjugal transfer of R factor by nalidixic acid, In Abstract of the IX International Congress for Microbiol., P549, Moscow
10. _____, Harada, K. & Kameda, M. 1961 Elimination of transmissible drug-resistance by treatment with acriflavin, *Nature*, **4763** : 947
11. _____, _____, _____ 1961 On the drug-resistance of enteric bacteria 6. Spontaneous and artificial elimination of transmissible drug resistance factor, *Japan. J. Exptl. Med.*, **31** : 119 ~ 123
12. 中谷林太郎, 寺脇良郎, 犬上洋子 1975 ヒト腸内細菌叢に対するジハイドロキシメチルフラトリジンの影響, *日細菌誌*, **30** : 113
13. _____, 吉川昌之介, 後藤延一 1972 R因子の分子遺伝学的研究の動向, *日細菌誌*, **27** : 5 ~ 26
14. 桶谷修三, 宮村定男, 川合敏男, 滝沢元, 野崎初美 1967 Nitrofurantoin 剤の耐性除去作用について, *日細菌誌*, **23** : 224
15. 齊藤龍雄, 小田和世, 菅原花登美, 渡辺力 1972 R因子による Moenomycin 感受性の増加の機作, *日細菌誌*, **27** : 210
16. 菅原花登美, 横山昌鶴, 渡辺力 1972 R因子による Rifampicin 感受性の増加, *日細菌誌*, **27** : 208
17. Todorov, T., Koleva, P., Fyodorov, V. & Neichev, S. 1974 Elimination in vitro of transmissible resistance to drugs in some enterobacteria, *Veterinarnomeditsinski Nauki, Bulgaria*, **11** : 3 ~ 9
18. Tomoeda, M., Inuzuka, M., Kubo, N. & Nakamura, S. 1968 Effective elimination of drug resistance and sex factors in *Escherichia coli* by sodium dodecyl sulfate, *J. Bact.*, **95** : 1078 ~ 1089
19. Watanabe, T. & Fukasawa, T. 1961 Episome-mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae II. Elimination of resistance factors with acridine dyes. *J. Bact.*, **81** : 679 ~ 683
20. 渡辺力, 緒方康子, 菅原花登美, 小田和世 1971 Flavomycin と R 因子, *日細菌誌*, **26** : 579

Summary

The eliminatory action of fradiomycin (FM), panfuran S (PFS) (=dihydroxymethyl furatrizine) and furazolidone (FZ) on R factors and also the specific action of these drugs on R factor-carrying (R^+) strains of *E. coli* was investigated.

1. A total of 12 R^+ strains were treated with sublethal concentration of each drug for 18 hrs. Then, cells were streaked on the heart infusion agar plate and drug resistance of each colony was tested. Thus, a total of 4,310 colonies were investigated. The frequencies of elimination were very low, such as 0.98% in FZ, 0.80% in FM and 0.75% in PFS. These values were rather low as compared with 2.92% in acriflavin and 1.27% in SDS which were obtained as control.

2. To investigate whether the specific action of the drugs on R^+ strains could be obtained, the average minimum inhibitory concentration (MIC) of 108 R^+ and 193 R^- strains

was calculated and was compared. As control, MIC of 193 susceptible (S) strains for AB-PC, SM, TC, CP, KM and SA was also obtained.

There were no differences between average MICs of the R⁺ and R⁻ in any drugs, however, the average MIC of the S strains was significantly lower than those of the R⁺ or R⁻ strains.

From the results obtained, the author could not conclude that the 3 drugs, FM, PFS and FZ, have eliminatory action on R factors and also specific action on R⁺ strains of *E. coli*.