

食品由来の Clostridium の化学療法剤に 対する感受性について

Susceptibility of Clostridium isolated from foods to various antimicrobial agents

小 林 と よ 子
浅 見 望

緒 言

著者らは、食品の防腐剤として AF-2 の使用が禁止されて以来、有芽胞嫌気性菌である Clostridium の汚染が著しいことを報告した。^{1, 2, 3)}

ところで、Clostridium の各種化学療法に対する感受性に関する研究は、人の常在菌叢由来株、臨床材料あるいは土壌由来株に限られ、食品由来株についての報告はない。著者らは、食品から分離した Clostridium を用いて、各種化学療法剤に対する感受性を検討したので報告する。

実 験 方 法

1. 使用菌株

使用菌株は表 1 に示した如く、各種の市販包装食品 143 検体（ソーセージ類 42、調理冷凍食品 50、魚肉練り製品 51）より、著者らが分離した Clostridium 170 株より無作為に選出した 120 株を用いた。すなわち、C. bifermentans 38 株、C. perfringens 30 株、C. sporogenes 18 株、およびその他の Clostridium spp. 34 株である。なお、その他の Clostridium spp. とは、C. putrificum 8 株、C. ghoni 6 株、C. subterminale 4 株、C. felsineum 3 株、C. paraperfringens 2 株、C. limosum 2 株、C. plagarum、C. mangenoti、C. oceanicum、C. putrificiens、C. tyrobutyricum、C. hasitiforme、C. lituseburense、C. irregularis、C. cadaveris 各 1 株である。

食品から分離した Clostridium は同定後、保護剤として 20% スキムミルクに浮遊させ、 -80°C の冷凍庫中に保存した。

表 1. 食品から分離した菌種

菌 種	食 品	ソーセージ類	冷凍食品	魚肉練り製品	計
		42	50	51	143 検体
<i>C. bifermentans</i>		9	12	17	38
<i>C. perfringens</i>		3	19	4	26
<i>C. sporogenes</i>		3	9	12	24
<i>C. felsineum</i>		9	4	1	14
<i>C. ghoni</i>		10	1	0	11
<i>C. putrificum</i>		1	6	2	9
<i>C. butyricum</i>		8	0	1	9
<i>C. manganoti</i>		6	1	0	7
<i>C. subterminale</i>		1	0	3	4
<i>C. plagarum</i>		3	1	0	4
<i>C. tyrobutyricum</i>		2	0	2	4
<i>C. lituseburensis</i>		2	1	0	3
<i>C. paraperfringens</i>		0	2	0	2
<i>C. hasitiforme</i>		0	2	0	2
<i>C. sartagoformum</i>		0	2	0	2
<i>C. cadaveris</i>		0	2	0	2
<i>C. limosum</i>		0	1	1	2
<i>C. irregularis</i>		2	0	0	2
<i>C. putrificans</i>		0	0	2	2
<i>C. lentoputrescens</i>		0	1	0	1
<i>C. sardiniensis</i>		1	0	0	1
<i>C. oceanicum</i>		0	0	1	1
計		60	64	46	170株

2. MIC 測定の使用薬剤

最低発育阻止濃度 (MIC: Minimum Inhibition Concentration) を測定するため, Penicillin-G (PC-G), Ampicillin (ABPC), Cefazolin (CEZ), Erythromycin (EM), Clindamycin (CLDM), Metronidazole (MET), Doxycycline (DOTC), Thiamphenicol (TP), Chloramphenicol (CP), Rifampicin (RFP), Kanamycin (KM), Dideoxynamycin B (DKB) の 12 剤を用いた。いずれの薬剤も力価の明らかなものを用いた。

3. MIC 測定法

化学療法剤に対する MIC の測定法は, 岐阜大学医学部微生物学教室で標準化した寒天平板希釈法⁹⁾によった。基礎培地には GAM 寒天培地を用い, 接種菌液はその生菌数が 1ml あたり, $10^5 \sim 10^6$ 個程度になる様に調整した。多目的アバラックスを用いて接種した。

菌液接種後, 直ちに Anaerobic glove box¹⁰⁾ 内で 37°C , 24 時間嫌気培養後, MIC 値を判定した。菌の発育阻止を示した化学療法剤の最小濃度をもって MIC 値とした。

実験成績

1. *C. bifermentans* の感受性分布

C. bifermentans 38 株について、12 剤の化学療法剤に対する MIC 値を累積百分率で示した成績を表 2 に示した。

表 2. *C. bifermentans* の化学療法剤に対する感受性分布 (38株)

薬 剤	MIC の 累 積 百 分 率 ($\mu\text{g/ml}$)										
	≤ 0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.26	12.5	25	50	100	100<
PC-G	100										
ABPC	87	100									
CEZ	5	8	11	22	97	100					
EM	87	95	100								
CLDM	97		100								
MET	100										
DOTC	97		100								
TP				5	46	81	100				
CP				27	100						
RFP	26	53	87	100							
KM								3	29	97	100
DKB								8	50	89	100

アミノ配糖体系抗生剤である KM, DKB の MIC 値は全菌株 $25 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性であった。一方, PC-G, ABPC, EM, CLDM, MET, DOTC の MIC は $0.78 \mu\text{g/ml}$ 以下の感受性であった。RFP に対しては $1.56 \mu\text{g/ml}$ 以下の MIC 値を示した。特に PC-G と MET は $0.19 \mu\text{g/ml}$ 以下で極めて感受性であった。TP は CP の誘導体であるが MIC 値は $1.56 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ で, CP の $1.56 \sim 3.13 \mu\text{g/ml}$ より MIC 値が劣っていた。CEZ の MIC 値は $6.25 \mu\text{g/ml}$ 以下であった。

2. *C. perfringens* の感受性分布

C. perfringens 30 株についての MIC 値を累積百分率で示した成績を表 3 に示した。

PC-G, RFP に対しては MIC 値が $0.19 \mu\text{g/ml}$ 以下の著しい感受性を示した。次いで, ABPC, CEZ, EM, CLDM, MET に対しても $3.13 \mu\text{g/ml}$ 以下の感受性を示した。TP と CP に対しては中等度の感受性が認められた。DOTC の *C. perfringens* に対する MIC 値は $0.78 \mu\text{g/ml}$ 以下と $6.25 \sim 12.5 \mu\text{g/ml}$ の 2 峰性の感受性分布を示した。すなわち, 食品由来株の *C. perfringens* においても耐性の獲得が示唆された。KM, DKB に対しては, $100 \mu\text{g/ml}$ 以上の高い耐性値を示した。

表 3. *C. perfringens* の化学療法剤に対する感受性分布 (30株)

薬 剤	MIC の 累 積 百 分 率 ($\mu\text{g/ml}$)										
	≤ 0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100<
PC-G	100										
ABPC	83	93	100								
CEZ	57	67	70	87	100						
EM	3	7	47	90	100						
CLDM	63		73	90	100						
MET	40	83	97	100							
DOTC	67	70	87			97	100				
TP				3	30	90	100				
CP				17	100						
RFP	100										
KM											100
DKB									13		100

3. *C. sporogenes* の感受性分布

C. sporogenes 18 株についての MIC 値の累積百分率の成績を表 4 に示した。

PC-G, ABPC, CEZ, MET, EM, DOTC に対して $0.78 \mu\text{g/ml}$ 以下の著しい感受性を示した。しかし, CLDM および EM に対しては $12.5 \mu\text{g/ml} \sim 25 \mu\text{g/ml}$ の耐性株が認められた。TP および CP に対しては中等度の感受性を示した。

RFP に対しては *C. perfringens* と異なり *C. bifermentans* と同様に中等度の感受性を示した。KM, DKB に対しては *C. bifermentans*, *C. perfringens* と同様に高い耐性を示した。

表 4. *C. sporogenes* の化学療法剤に対する感受性分布 (18株)

薬 剤	MIC の 累 積 百 分 率 ($\mu\text{g/ml}$)										
	≤ 0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100<
PC-G	100										
ABPC	88	100									
CEZ	100										
EM	47	88	94					100			
CLDM	24	29		41	82	94	100				
MET	100										
DOTC	100										
TP				24	59	94	100				
CP				80	100						
RFP	44	56		83	100						
KM									6	11	100
DKB							6			22	100

4. その他の Clostridium spp. の感受性分布

C. bifermentans, C. perfringens および C. sporogens 以外の Clostridium の菌種について MIC 値の累積百分率の成績を表 5 に示した。

表 5. その他の Clostridium の化学療法剤に対する感受性分布 (34株)

薬 剤	MIC の 累 積 百 分 率 ($\mu\text{g/ml}$)										
	≤ 0.19	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	100<
PC-G	91	97	100								
ABPC	89	97	100								
CEZ	31	57	83	86	100						
EM	57	74	89	94	97			100			
CLDM	69	74	89	89	97		100				
MET	91	97	100								
DOTC	91	94			100						
TP	3		11	31	71	94	100				
CP			33	100							
RFP	71	88	97	100							
KM							12	15	21	50	100
DKB							9	12	38	56	100

C. bifermentans, C. perfringens および C. sporogenes とほぼ同様の MIC 値を示した。すなわち, PC-G, ABPC, CEZ, MET, DOTC, CP, RFP に対しては比較的感受性を示した。しかし, EM および CLDM に対しては $12.5 \mu\text{g/ml} \sim 25 \mu\text{g/ml}$ の耐性株が認められた。KM および DKB に対しては $12.5 \mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した。

考 察

家畜および養魚の発育促進または疾病予防の目的で化学療法剤を飼料に添加して飼料効率を上げている。しかし, 飼料に添加された化学療法剤は最終製品である食品 (獣肉, 魚肉, 鶏卵, 牛乳) 中に微量ではあるが残留し, 細菌の耐性獲得や人体に対するアレルギーの獲得などが考えられるので, その使用は慎重でなければならない。農林省はこの点を検討し, 1977年1月「飼料の安全性の確保および品質の改善に関する法律」を公布し, 飼料添加剤の種類, 使用品目および出荷前の使用禁止期間などの規制が設けられ実施された。

従来, 家畜の飼料に添加された抗生物質はテトラサイクリン, ペニシリン, ストレプトマイシン, バシトラシン, マクロライド系抗生剤などが使用されている。また, 養魚方面にもテトラサイクリン, スルホンアミド剤, ニトロフラン誘導体, クロラムフェニコールなどの化学療法剤が使用されている。特に, 家畜の飼料に添加されている抗生剤の量は, 耐性菌の選択をひき起こすのに十分な量であることから, 腸管内で耐性菌が増加するものと考えられる。事実^{11, 12, 13)} 家畜および養魚から分離された好気性のグラム陰性桿菌には耐性菌の増加が認められている。¹⁴⁾

また、家畜の腸管内にはR因子を保有するサルモネラが高頻度¹⁵⁾に分布している。しかし、家畜および養魚から分離した嫌気性菌の薬剤耐性菌については全く検討されていないが、好気性菌と同様、嫌気性菌においても耐性菌が分布していることも考えられる。

さて、ソーセージ類、冷凍食品、魚肉練り製品からは嫌気性菌である *Clostridium* が高頻度^{1, 2)}に分離された。これらの食品における *Clostridium* による汚染は原料肉（家畜および魚肉）に由来することが考えられる。

また、食品から分離された *Clostridium* には人に食中毒をはじめ、ガス壊疽、その他の一般感染症の起因菌となりうる *C. perfringens*, *C. bifermentans*, *C. limosum* その他の菌種が含まれている。

このような意味においても食品由来の *Clostridium* の化学療法剤に対する耐性菌の分布を検討する意義があると思われる。

嫌気性菌はすべてアミノ配糖体系抗生剤に自然高度耐性であるため、供試した *Clostridium* の全菌株が、KM, DKB に高度耐性であることは当然である。

一方、PC-G, ABPC, MET, CP, RFP に対しては全菌株が高度感受性で、耐性株は認められなかった。従って、飼料の添加剤としてのペニシリン、クロラムフェニコールなどは動物の常在菌叢中の *Clostridium* の耐性化に関与したと考えられる成績は得られなかった。しかし、EM, CLDM, DOTC, TP に対しては *C. perfringens*, *C. sporogenes*, *C. bifermentans* などに耐性株が認められた。これらの耐性株は飼料添加の抗生剤によるものか、あるいは、人由来の耐性株による食品汚染によるものかについて明らかでない。しかし、これらの抗生剤は、現在感染症の治療に広く使用されているため、人由来の耐性株を否定することは出来ない。ずれにせよ、食品から分離した *Clostridium* に EM, CLDM, DOTC に対する耐性株が認められたことは、食品公害の一種ともみるべきで、十分留意し、さらに詳細に検討する必要があると思われる。

なお、*C. bifermentans* は *C. perfringens*, *C. sporogenes* などと異なり、CEZ に対して比較的耐性であるのが特徴であった。

ま と め

食品由来の *Clostridium* 120 株について、PC-G, ABPC, CEZ, EM, CLDM, MET, DOTC, TP, CP, RFP, KM, DKB の化学療法剤に対する感受性を検討した結果、つぎの様な成績が得られた。

- 1) PC-G, ABPC, MET, CP, RFP に対しては全菌株が感受性であった。
- 2) EM, CLDM, DOTC, TP に対しては耐性株が認められた。
- 3) アミノ配糖体系抗生剤である KM, DKB に対しては、全菌株自然高度耐性であった。

終りに種々な御便宜をはかり、御指導賜わった岐阜大学医学部微生物学教室の鈴木祥一郎教授、上野一恵助教授に深く御礼を申し上げます。

文 献

- 1) 小林とよ子ほか (1976) : 東海学園女子短期大学紀要, 11, 19-24.
- 2) 小林とよ子ほか (1977) : 東海学園女子短期大学紀要, 12, 19-28.
- 3) 小林とよ子ほか (1977) : 嫌気性菌感染症研究会講演記録, 7, 30-36.
- 4) Sutter, V. L. et al (1976) : Susceptibility of anaerobic bacteria to 23 antimicrobial agents, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10, 736-752.
- 5) 上野一恵ほか (1971) : 嫌気性菌に対する Metronidazole の抗菌作用, *Chemotherapy*, 19, 111-114.
- 6) Tally, F. P. et al (1974) : Susceptibility of *Clostridium ramosum* to antimicrobial agents, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 5, 589-593.
- 7) Chow, A. W. et al (1975) : Comparative susceptibility of anaerobic bacteria to Minocycline, Doxycycline, and Tetracycline, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7, 46-49.
- 8) 三和敏夫ほか (1975) : 南極大陸の土壌から分離された *Clostridium perfringens* の化学療法剤に対する感受性, *医学と生物学*, 91, 57-61.
- 9) 小沢敦編 (1977) : 臨床細菌学, 講談社, 東京。
- 10) 上野一恵 (1977) : 検査と技術, 5, 267-268.
- 11) Jukes, T. H. (1971) : The present status and background of antibiotics in the feeding of domestic animals, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 182, 362-369.
- 12) 渡辺 力 (1966) : 化学療法と耐性菌, 朝倉書店。
- 13) Guinee, P. A. M. (1971) : Bacterial drug resistance in animals, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 182, 40-51.
- 14) Watanabe T. et al (1972) : Fish culturing and R-factors, in *Bacterial Plasmids and Antibiotic Resistance* (Spring-Verlag, Berlin), pp. 131-141.
- 15) Anderson, E. S. (1968) : Drug resistance in *Salmonella* and its implication, *Brit. Med. J.* (iii), 333-340.