

大腸菌から腸炎ビブリオへの多剤耐性の接合による伝達

阿 部 久 夫

横浜検疫所

五 島 瑳 智 子・桑 原 章 吾

東邦大学医学部微生物学教室

(昭和 42 年 9 月 11 日受付)

腸内細菌から *Vibrio* への R 因子の伝達については BARON ら¹⁾(1961) は *Salmonella typhi* から *Vibrio cholerae* へ, KUWABARA ら²⁾(1963) は *Shigella flexneri* から *Vibrio cholerae* と El Tor *vibrio* への伝達を報告した。その後, 阿部ら³⁾(1966) は *Shigella flexneri* から *Aeromonas*, および非凝集性 (NAG) *Vibrio* へも接合によつて R 因子が伝達されることを報告し, さらに阿部ら⁴⁾(1966) は *Escherichia coli* から *Vibrio* への伝達実験を行ない, *Vibrio* も腸管内で因子をうけとる可能性は十分にあるが, 一般に *Vibrio* 菌体内の R 因子の維持は不安定であるため腸内細菌のように安定した高度多剤耐性株の生ずることは少ないであろうと推察した。しかしそれと時期を前後して KUWABARA ら⁵⁾(1966) は, Philippine 分離の El Tor *vibrio* から Tetracycline (TC), Chloramphenicol (CP), Streptomycin (SM) に対して単剤, あるいは 2 剤, 3 剤耐性, さらに多剤耐性株も発見し, これまで試験管内で, その可能性を予測してきたことが現実の問題となつたのである。

一方 *Vibrio* 属に含まれている *Vibrio parahaemolyticus* の薬剤感受性成績は, 宮村ら⁶⁾(1966), および善養寺ら⁷⁾(1966) によつて報告され, 私たち⁸⁾の成績でも TC, CP に耐性の株は発見されず, また *Vibrio parahaemolyticus* への R 因子の伝達実験の報告もなされていない。私たちは, R 因子をもつ *Escherichia coli* から *Vibrio parahaemolyticus* および *Vibrio alginolyticus* へ接合によつて耐性が伝達されることを実証できたので, そのあらましを報告する。

実験方法

1) 供試菌株: Donor としては患者から分離した *Escherichia coli* 60-R₄ 株と *E. coli* 62-R₄ 株の 2 株 (TC, CP, SM, SA の 4 剤耐性) を, Recipient には次の 25 株を用いた。 *Vibrio parahaemolyticus* は横浜検疫所で 1966 年に患者から分離した 10 株 (N 1, N 2, N 3, N 4, T 8, N 9, N 10, N 11, N 12, N 13) と東京都立衛生研究所 (都衛研) 分離の 10 株 (T 2079, T 2090, T 2091, T 2092, T 2106, T 2132, T 2144, T 2164, T

2174, T 2189), *Vibrio alginolyticus* は都衛研分離の 5 株 (T 124, T 131, T 151, T 168, T 271) の使用したほか, 対照として *Vibrio cholerae* VC 90 株 (1961 年分離) を用いた。再伝達実験の Recipient には *Shigella flexneri* MZ 株, *Salmonella typhi* 田口株, *Escherichia coli* No. 12 株を使用した。

2) 耐性伝達実験: Donor および Recipient 菌株は, それぞれ 1% NaCl 加 broth で 3 代継代培養を行なつたのち, 同一 broth の 1 夜培養菌液をそれぞれ 1 ml づつ混合した。20 時間 37°C に静置したのち混合菌液の全量を CP 5 mcg/ml 加 TCBS 培地平板 10 枚にコンラージ棒で塗抹し, 37°C 48 時間培養後, 発生した全集落を釣菌, 同培地で再分離してから 3% NaCl 加 Heart infusion (H I) agar を使用して腸菌斑法で耐性を測定し, 同時に生物学的諸性状を検査して菌種を確認した。

3) 再伝達実験: 耐性をうけとつた *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* から感受性の *Sh. flexneri*, *Sal. typhi* および *E. coli* への耐性再伝達実験は, 1 次伝達実験と同じ手順で行なつた。選択培地は Recipient が *Sh. flexneri* と *Sal. typhi* の場合は CP 5 mcg/ml を加えた 1% Sucrose 加 SS 培地を, *E. coli* の場合は CP 5 mcg/ml 加 EMB 培地を使用し, Donor と Recipient の混合菌液の 0.1 ml を 1 平板にそれぞれ 5 枚づつ塗抹した。

4) 継代による耐性の脱落: 再分離培地に発育した耐性集落を釣菌し, 3% NaCl 加 broth 37°C, 24 時間培養菌液の 1 白金耳を 5 ml の同一 broth に接種して継代をくりかえした。各継代とも broth 培養菌液を原液として 10⁻⁷ まで段階希釈し, それぞれの希釈液について 3% NaCl 加 H I agar を使用して腸菌斑法で耐性を測定し耐性菌数の消長を推定した。

実験成績

1) 耐性伝達の頻度: CP 5 mcg/ml 加 TCBS 培地を選択培地に使用して実験を行なつたところ (Table 1), *V. parahaemolyticus* は 20 株のうち, Donor が *E. coli*

Table 1 Frequencies of transmission of multiple drug-resistance from resistant *E. coli* to sensitive *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*

Recipient strain		Donor strain	
		<i>E. coli</i> 60-R ₄	<i>E. coli</i> 62-R ₄
<i>V. parahaemolyticus</i> (20 strains)	N 11	0.75 × 10 ⁻⁸ **	0
	N 12	0	1.38 × 10 ⁻⁸
	T 2106	0.13 × 10 ⁻⁸	2.5 × 10 ⁻⁶
	T 2164	0	4.5 × 10 ⁻⁸
	N 1, N 2, N 3, N 4, N 8, N 9, N 10, N 13, T 2090, T 2091, T 2132, T 2079, T 2092, T 2144, T 2174, T 2189,	0	0
<i>V. alginolyticus</i> (5 strains)	T 168	1.75 × 10 ⁻⁸	0
	T 131, T 151, T 124, T 271	0	0
<i>V. cholerae</i>	VC 90	3.0 × 10 ⁻⁷	1.5 × 10 ⁻⁷

* Transmission frequencies were calculated by

$$\frac{\text{number of recipient cells receiving R factor}}{\text{total number of the recipient cells}}$$

60-R₄ 株の場合、N 11 株と T 2106 株の 2 株(10%)に 0.13~0.75 × 10⁻⁸ の頻度で、また、Donor が *E. coli* 62-R₄ 株の場合は N 12 株と T 2164 株は 1.38~4.5 × 10⁻⁸、T 2106 株では 2.5 × 10⁻⁶ の頻度で 3 株(15%)に耐性集落が出現した。*V. alginolyticus* は 5 株のうち、*E. coli* 60-R₄ 株が Donor の場合にだけ T 168 株び 1.75 × 10⁻⁸ の頻度で耐性集落が出現しただけであつた。対

照の *V. cholerae* VC 90 株ではいづれが Donor の場合でも 10⁻⁷ の頻度で伝達が行なわれた。

2) 伝達菌の耐性度：実験に使用した *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* は SM と SA には自然耐性であるため、TC と CP に対する耐性を測定して伝達を確認した。選択培地に発育したすべての集落を釣菌してしらべたところ (Table 2), *V. parahaemolyticus* は集落の違いによる耐性度の差が大きく、TC に対しては 100 mcg/ml の高度耐性の集落も N 12 株に 1 コ出現したが、他の菌株では 80.0% 以上の集落は 5~10 mcg/ml のかなり低い耐性を示し、また T 2106 株と T 2164 株では CP に耐性で TC には感受性の集落が 20.0% 出現した。CP に対しては 70.0% 以上の集落は 25~50 mcg/ml の耐性を示したが、N 12 株と T 2164 株では 100 mcg/ml の高度耐性の集落も各 1 コずつ認められ、また T 2164 株と T 2106 株には 5~10 mcg/ml のかなり低い耐性を示す集落が 26.0~30.0% 出現した。*V. alginolyticus* では TC に 10~25 mcg/ml、CP には 50~100 mcg/ml の耐性であつた。*V. cholerae* は TC に 10 mcg/ml、CP には 25~50 mcg/ml、SM には 50~100 mcg/ml の耐性を示した。以上の成績から Donor と同等の耐性を示す集落は *V. parahaemolyticus* N 12 株に 1 コ出現しただけで、一般に Recipient の耐性度は Donor よりもかなり低いことがわかつた。

3) 再伝達実験：耐性伝達をうけた *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* の各菌株を、1 菌株についてそれぞれ 2 コの集落を Donor として再伝達実験を行なつたところ (Table 3), *Sh. flexneri* MZ 株では Donor が *V. parahaemolyticus* T 2164-R₄ 株の場合は 1.0~2.0 × 10⁻⁷ の頻度で、Donor が *V. alginolyticus*

Table 2 Degree of drug-resistances of strains of *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* after receiving R factor from resistant *E. coli*

Recipient strain		before transmission			after transmission		
		TC	CP	SM	TC	CP	SM
<i>V. parahaemolyticus</i>	N 11 ^{(1)*}	0.78**	1.56	100	10	25-50	100
	N 12 ⁽²⁾	0.78	1.56	100	10-100	50-100	100
	T 2106 ⁽¹⁾	0.78	0.78	100	5	10	100
	T 2106 ⁽²⁾				5-10	5-25	100
	T 2164 ⁽²⁾				5-25	10-100	100
<i>V. alginolyticus</i>	T 168 ⁽¹⁾	0.78	0.78	100	10-25	50-100	100
<i>V. cholerae</i>	VC 90 ⁽¹⁾	0.39	0.78	5	10	25-50	50-100
	VC 90 ⁽¹⁾				10	50	50-100

* (1) : donor *E. coli* 60 R₄ (2) : donor *E. coli* 62 R₄

** Each figure indicates the sensitivity to the appropriate antibiotic in terms of mcg per ml.

Table 3 Retransmission frequencies from resistantized strains of *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* to sensitive strains of *Sh. flexneri*, *Sal. typhi* and *E. coli*

Donor strain				Recipient strain		
Species	Strains	Degree of drug resistances		<i>Sh. flex.</i>	<i>Sal. typhi</i>	<i>E. coli</i>
		T C (mcg/ml)	C P (mcg/ml)			
<i>V. parahaemolyticus</i>	N 11-R ₄ -1	10	50	0	0	0
	N 11-R ₄ -2	10	50	0	0	0
	N 12-R ₄	10	50	0	0	0
	T 2106-R ₄ -1	10	25	0	0	0
	T 2106-R ₄ -2	10	25	0	0	0
	T 2164-R ₄ -1	25	100	1.0×10^{-7}	0	0
	T 2164-R ₄ -2	25	100	2.0×10^{-7}	0	0
<i>V. alginolyticus</i>	T 168-R ₄ -1	25	50	0	0	0
	T 168-R ₄ -2	25	100	7.0×10^{-6}	0	0
<i>V. cholerae</i>	VC 90-R ₄	10	50	0	1.5×10^{-7}	0

Table 4 Degree of drug-resistances of recipients of the retransmission after receiving R factor from resistantized *V. parahaemolyticus*

Recipient	Donor	original sensitivities				after retransmission			
		T C	C P	S M	S A	T C	C P	S M	S A
<i>Sh. flexneri</i> MZ	T 2164-R ₄ -1					100	100	100	1000
	T 2164-R ₄ -2	0.13	1.25	5	1000	100	100	100	1000
	T 168-R ₄ -2					100	100	100	1000
<i>Sal. typhi</i> Taguchi	VC 90-R ₄	0.31	1.25	10	1000	100	100	100	1000

TC, CP, SM : mcg/ml, SA . mg %

Table 5 Spontaneous segregation of transmitted resistances of resistantized vibrio strains during successive transfers in drug-free nutrient broth

Strain	Control	Drug	Number of resistant cells in each subculture					
			1	2	3	4	5	10
<i>V. parahaemolyticus</i>	N 11-R ₄	T C	10 ¹					
		C P	10 ²	10 ⁰				
	N 12-R ₄	T C	10 ⁰					
		C P	10 ¹	10 ⁰				
	T 2106-R ₄	T C	10 ⁰					
		C P	10 ²					
	T 2164-R ₄	T C	10 ³	10 ³	10 ⁰			
		C P	10 ⁴	10 ²	10 ⁰			
<i>V. alginolyticus</i>	T 168-R ₄	T C	10 ³	10 ²	10 ⁰			
		C P	10 ³	10 ³	10 ¹	10 ⁰		
<i>V. cholerae</i>	VC 90-R ₄	T C	10 ³	10 ²	10 ⁰			
		C P	10 ³	10 ³	10 ¹	10 ⁰		
<i>Sh. flexneri</i>	MZ-R ₄	T C	10 ⁷		10 ⁷		10 ⁷	
		C P	10 ⁷		10 ⁷		10 ⁷	

T 168-R₄ 株の場合は 7.0×10^{-6} の頻度で再伝達されたが、その他の Donor では再伝達集落は認められなかつた。再伝達をした Donor の耐性度はいづれも、TC に 25~50 mcg/ml, CP には 100 mcg/ml の比較的高い耐性で、再伝達の行なわれなかつた Donor ではそれよりもかなり低かつた。*Sal. typhi* 田口株、および *E. coli* No. 12 株では、いづれの Donor でも再伝達集落は出現しなかつたが、*V. cholerae* VC 90-R₄ 株が Donor の場合には *Sal. typhi* 田口株に 1.5×10^{-7} の頻度で再伝達が行なわれた。

再伝達された *Sh. flexneri* MZ 株の耐性表現は TC, CP, SM に対して、すべて 100 mcg/ml の高度耐性を示し (Table 4), 再伝達 Donor の耐性度よりも高く、1 次伝達の Donor と同等の耐性度を示した。

4) 伝達株の継代による耐性の脱落: *E. coli* から R 因子の伝達をうけた *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* の耐性菌数の消長を各継代ごとに段階希釈法によつてしらべたところ (Table 5), 無薬剤培地では 10^{-7} まで発育するのに対して、TC あるいは CP 加培地には、*V. parahaemolyticus* の N 11-R₄ 株, N 12-R₄ 株、および T 2106-R₄ 株では 1 代継代で 10^{-2} ~ 10^0 までより発育せず、耐性菌数は $1/10^5$ 以下に減少し、3 代継代で耐性菌はすべて消失した。T 2164-R₄ 株では 1 代継代で耐性菌数は $1/10^3$ 以下に減少し、4 代継代ですべて感受性化した。*V. alginolyticus* は 1 代継代で耐性菌数は $1/10^2$ ~ $1/10^3$ に減少し、5 代継代ですべての耐性菌が消失した。

V. parahaemolyticus-R₄ 株、および *V. alginolyticus*-R₄ 株から耐性再伝達された *Sh. flexneri* MZ 株は 10 代継代しても耐性菌数の減少は認められず初代と同等の高度耐性を維持した。

考 察

私たちは^{3,4)}、これまでに腸内細菌の R 因子が *V. cholerae*, *El Tor vibrio* および *NAG Vibrio*, さらに *Aeromonas* にも伝達されることを報告したが、今回の実験では *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* にも R 因子が伝達されることを確認した。宮村ら⁹⁾、善養寺ら⁷⁾、および私たち⁹⁾の成績では近年分離された *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* の多数の菌株は SM と SA には耐性を示すが TC と CP にはすべて感受性である。本実験では TC と CP を marker にし、CP で選択して行なつた。

耐性伝達は Donor と Recipient の組合せによつて異なり、*V. parahaemolyticus* は 20 株のうち Donor の違いによつて 10~15% の菌株に伝達され、また *V. alginolyticus* では 5 株のうち 1 株に伝達されただけで、伝

達の確率は、KUWAHARA²⁾らの報告、さらに著者らの^{3,4)} *Sh. flexneri* から *Aeromonas*, および *NAG Vibrio* への伝達実験、および *E. coli* から *Vibrio* への伝達実験よりも著るしく低かつた。伝達頻度は 10^{-4} が株だけで、他はすべて 10^{-8} のレベルで、著者ら⁴⁾の *E. coli* から *Vibrio* への伝達頻度とほぼ同じで、TCBS 培地を選択培地に使用したためこの程度の頻度になつたものと考えられる。TCBS 培地は *Vibrio* の最も強力な選択培地で、小林ら⁹⁾、および桑原は¹⁰⁾非選択培地の 100 分の 1 の発育しか示さないとしている。

E. coli から耐性を伝達された *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* の耐性表現は、Donor と同等の高度耐性を示す集落も少数認められたが、大多数の集落は Donor よりもかなり低い耐性で、特に TC に対しては低く、また集落の違いによる耐性表現の差が極めて大きかつた。このことは吾々^{3,4)}の *Sh. flexneri* から *Aeromonas*, および *NAG Vibrio* への伝達実験、および *E. coli* から *Vibrio* への伝達実験の成績とほとんど同じである。

先回⁹⁾の *Sh. flexneri* から *Aeromonas* および *NAG Vibrio* への伝達実験では、TC 選択集落の 4.5% が TC 単独耐性であつたが、今回の実験では CP で選択し、TC に感受性の集落が T 2106 株と T 2164 株に 20.0% 出現した。これと同様なことについては渡辺¹¹⁾はネズミチフス菌 LT 2 の導入株で、CP で選択したものは CP, SM, SA に耐性で、TC に感受性、TC で選択したものは、他の 3 剤に感受性であることを報告している。

伝達をうけた *V. parahaemolyticus*, および *V. alginolyticus* からの再伝達実験は、耐性度の比較的高い Donor からのみ *Sh. flexneri* MZ 株だけに耐性は再伝達され、その耐性表現は再伝達 Donor の耐性度よりも高く、1 次伝達の Donor と同等の耐性度を示した。*V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* は SM, SA には耐性であるため TC と CP の伝達より確認できなかつたが、再伝達された *Sh. flexneri* MZ 株で SM の伝達もたしかめられ、R 因子が伝達されたことは確実である。

Vibrio 菌体内の R 因子は不安定で継代することによつて急速に自然脱落することは、KUWAHARA²⁾らの報告、および吾々^{3,4)}の *Sh. flexneri* から *Aeromonas* および *NAG Vibrio* への伝達実験、および *E. coli* から *Vibrio* への伝達実験で報告したが、今回の実験でもそれとよく一致し、3~5 代継代ですべて感受性化した。

以上のことから、*V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* も腸管内において R 因子をうけとる可能性はあるが、その確率は極めて低いこと、また *V. para-*

haemolyticus および *V. alginolyticus* 菌体内における耐性因子は不安定で急速に感受性化する事、さらに *V. parahaemolyticus* は人から人への感染例は認められていないこと、などから腸内細菌のように安定した高度多剤耐性株を生ずることは極めて稀であろうと推定される。

結 論

1) *E. coli* 60-R₄ 株、および *E. coli* 62-R₄ 株から *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* への R 因子の接合による伝達を確認した。

2) R 因子の伝達は Donor と Recipient の組合せによつて異なり、*V. parahaemolyticus* では 20 株のうち Donor の違いによつて 10~15% に、*V. alginolyticus* では 5 株のうち 1 株に伝達されただけで、伝達する確率は極めて低い。

3) *V. parahaemolyticus* および *V. alginolyticus* への耐性伝達の頻度、耐性表現、および耐性因子の自然脱落、さらに再伝達された *Sh. flexneri* の耐性表現、耐性因子の安定性等は、KUWAHARA らの報告、および先回の *Sh. flexneri* および *E. coli* から *Vibrio* への伝達実験のそれとよく一致する。

文 献

- 1) BARON, L. S. & S. FALKOW: Genetic transfer of episomes from *Salmonella typhosa* to *Vibrio comma*. *Genetics* 46: 849, 1961
- 2) KUWAHARA, S.; T. AKIBA, K. KOYAMA & T. ARAI: Transmission of multiple drug-resis-

tance from *Shigella flexneri* to *Vibrio comma* through conjugation. *Jap. J. Microbiol.* 7: 61~68, 1963

- 3) 阿部久夫, 五島差智子, 桑原章吾: 赤痢菌から *Aeromonas* および非凝集性ビブリオへの多剤耐性の接合による伝達。日本細菌学雑誌 21(5):266~273, 1963
- 4) 阿部久夫, 五島差智子, 桑原章吾: 大腸菌から *Vibrio* への多剤耐性の接合による伝達。J. Antibiotics, Ser. B 19(5): 346~349, 1966
- 5) KUWAHARA, S.; S. GOTO, M. KIMURA & H. ABE: Drug-sensitivity patterns of strains of El Tor vibrio isolated in the Philippines in 1964 and 1965. *Bul. WHO* (in press)
- 6) 宮村定男, 重野直也, 富田瀏: 腸炎ビブリオの各種化学療法剤感受性について。日本細菌学雑誌 21(5): 256~265, 1966
- 7) 善養寺浩, 大久保暢夫, 五十嵐英夫, 堀幹郎, 坂井千三: 腸炎ビブリオおよびコレラ菌の各種抗菌剤に対する感受性。日伝病誌 40(9): 337~344, 1966
- 8) 阿部久夫, 木村正健, 会田俊雄: 外航船舶に発生した腸炎ビブリオによる集団食中毒例について。日公衛誌 (投稿中)
- 9) 小林俊一, 榎本省二: コレラ菌および好塩菌分離用「中西の培地」の検討。モダンメディア 9(7): 250~253, 1963
- 10) 桑原章吾: 最近の選択培地の原理とその使い方。臨床病理 11(10): 569~574, 1964
- 11) 渡辺力: 腸内細菌のエピゾーム性耐性因子 (第 17 報) ネズミチフス菌における耐性因子の導入 (続報)。医学と生物学 65(2): 44~47, 1962

TRANSMISSION OF MULTIPLE DRUG-RESISTANCE FROM RESISTANT *ESCHERICHIA COLI* TO SENSITIVE STRAINS OF *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*

HISAO ABE

Yokohama Quarantine Station, Yokohama, Japan

SACHIKO GOTO and SHOGO KUWAHARA

Department of Microbiology, Toho University School of Medicine, Tokyo, Japan

It was already reported by KUWAHARA and his coworkers (1963) that the multiple drug-resistance of *Shigella flexneri* can be transmitted to sensitive strains of *V. cholerae* and El Tor vibrio through conjugation, and that the recipients generally lost the transmitted resistance after repeated transfers on drug-free nutrient media. Later, ABE *et al.* (1966) confirmed that such transmission process also take place between *Shigella* or *E. coli* and NAG vibrio or *Aeromonas*. In Japan, there are many cases of food-poisoning due to *V. parahaemolyticus*, which are detected frequently in the near-sea water of Japan and South East Asia. Although none of the isolates of *V. parahaemolyticus* are resistant to chloramphenicol and tetracycline, there may give rise to the possibility of the emergence of multiple-resistant strains. This report deals chiefly with the experimental results of the transmission of R factor from resistant *E. coli* to sensitive strains of *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*.

Two strains of multiple-resistant *E. coli* (SA. SM. CM. TC) were chosen as the donors of R factor,

and 20 strains of *V. parahaemolyticus* and 5 strains of *V. alginolyticus* were tested for their competence to serve as recipients of R factor. Using TCBS agar containing 5 mcg/ml of CM as selective plate. A few strains out of the test strains of *V. parahaemolyticus* were found competent recipient of R factor according to the donor used, and among 5 strains of *V. alginolyticus* only one strain received R factor, when the strain 60-R₄ was used as the donor.

Many of the recipient colonies of *V. parahaemolyticus* were resistant to CM and TC at the level of 5~10 mcg/ml, considerably lower than the resistances of the donors; whereas recipient colonies of *V. alginolyticus* were highly resistant to CM, although TC resistance was generally low.

Retransmission from resistantized vibrio to sensitive strains of *E. coli*, *Shigella flexneri* or *Sal. typhi* were also accomplished, and the recipients were highly resistant to SM, CM and TC, quite same level as the original donor.

As in the cases of other species of *Vibrio*, resistantized *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus* lost their resistances after 3 successive transfers on drug-free nutrient agar.