



# 岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

## 動物由来カンピロバクターの薬剤耐性とプラスミド

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 成田, 美香, 中村, 浩子, 金城, 俊夫, 源, 宣之, 杉山, 誠 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12099/5832">http://hdl.handle.net/20.500.12099/5832</a>

## 動物由来カンピロバクターの薬剤耐性とプラスミド

成田美香・中村浩子・金城俊夫・源 宣之・杉山 誠

獣医公衆衛生学研究室  
(1988年8月1日受理)

## Antimicrobial Resistance and Plasmid Analysis of Campylobacter Species Isolated from Animals

Mika NARITA, Hiroko NAKAMURA, Toshio KINJO,  
Nobuyuki MINAMOTO and Makoto SUGIYAMA

*Laboratory of Veterinary Public Health  
(Received August 1, 1988)*

### SUMMARY

One hundred-thirty strains of *Campylobacter* isolated from a variety of species of animals were tested for susceptibility to tetracycline (TC), kanamycine (KM), streptomycine (ST), ampicillin (APC) and chloramphenicol (CP), and also were examined for the occurrence of plasmid DNA. The results obtained were summarized as follows :

1. Forty-five (34.6%) of the 130 strains were resistant to any one of the 5 antibiotics. TC resistance was the most common (21.5%), followed by KM (13.1%), SM (4.6%) and APC (1.5%), in descending order. No strain resistant to CP was observed. Conjugative R plasmid was not demonstrated in any resistant strains by the routine method.

2. Of the isolates examined, 57.7% were noted to harbor plasmid DNA, ranging in size from 1.2 to 360 megadalton (Mdal) by agarose gel electrophoresis. Plasmid occurrence rates of the isolates from several animal species equally exceeded 50%.

3. A plasmid occurrence rate of 86.7% (39/45) was obtained for antibiotic resistant strains, contrasted to lower plasmid occurrence rate of 42.6% (36/85) for susceptible strains.

4. Among TC resistant strains, 41, 72, 110 and 360 Mdal plasmids were commonly found in 54.2%, 29.2%, 8.3% and 12.5%, respectively. By contrast, among KM resistance, rather smaller size of 2.2, 2.6, 4.2 and 10 Mdal plasmids were observed in 26.7%, 40%, 46.7% and 33.3%, respectively. However, no plasmid specified TC or KM resistance was observed.

5. The same plasmid profiles and resistance patterns were found among strains isolated from diarrheic monkeys breeding as one group in an indoor pen.

These results suggest that antimicrobial resistance and plasmid profile are potentially useful epidemiological markers for campylobacter infection.

Res. Bull. Fac. Agr. Gifu Univ. (53) : 375—384, 1988.

### 総 括

動物由来のカンピロバクター130株を対象に、テトラサイクリン(TC)、カナマイシン(KM)、ストレプトマイシン(SM)、アンピシリン(APC)及びクロラムフェニコール(CP)の5種の抗生物質に対する薬

剤感受性試験とプラスミドの解析を行った。得られた成績は以下の通りである。

1. 130株中45株, 34.6%が何れかの抗生物質に耐性であった。その中で TC 耐性株が28株 (21.5%)で最も多く, 次いで KM (13.1%), SM (4.6%) 及びAPC (1.5%) 耐性の順で, CP 耐性株は全く検出されなかった。耐性株について伝達性Rプラスミドの検索を通常の方法で行ったが, 全例陰性であった。

2. 130株中75株, 57.7%に1.2~360メガダルトン(Mdal)のプラスミドが確認された。プラスミドの保有率は, サル, ネズミ, ニワトリ, イヌ, ハト何れの動物由来株でも50%を超えた。

3. 薬剤耐性株と感受性株との間で, プラスミド保有率を比較したところ, 前者のそれが86.7%(39/45)に対し, 後者は42.6%(36/85)で, 薬剤耐性株の方が高率にプラスミドを保有していた。

4. 薬剤耐性株のプラスミドDNAの分子量を調べたところ, TC耐性株では41, 72, 110及び360Mdalのプラスミドがそれぞれ54.2, 29.2, 8.3及び12.5%の株に共通してみられた。KM耐性株では2.2, 2.6, 4.2及び10Mdalの比較的小さなプラスミドが, それぞれ26.7, 40, 46.7及び33.3%の株に共通して検出された。しかし, 何れの場合も薬剤耐性とある特定の大きさのプラスミドを関連づけることはできなかった。

5. 同一集団のサルの下痢流行時に分離された株の薬剤耐性パターンとプラスミドプロファイルは同じで, これらがカンピロバクター感染症あるいは食中毒発生時の原因菌の究明の際の疫学マーカーになりうる可能性が示唆された。

## 結 言

カンピロバクターの簡易な選択分離培養法が確立されて以来, 本菌によるヒト腸炎の症例が世界各地で相次いで報告されるようになった<sup>1)</sup>。なかでも *Campylobacter jejuni* は腸炎起炎菌として最も重要な位置を占めている<sup>2-5)</sup>。わが国においても, 本菌はヒト特に小児の感染性腸炎の原因菌として, *Salmonella* spp., *Vibrio parahaemolyticus* あるいは *Shigella* spp. を凌駕している<sup>5,6)</sup>。*C. coli*, *C. fetus* 及び *C. laridis* 等も稀ではあるがヒトに腸炎を起こすことが知られている<sup>7)</sup>。また, *C. jejuni* と *C. coli* は1982年から食中毒菌にも指定され, 食品衛生上も重要な菌となっている<sup>7)</sup>。

カンピロバクターは各種動物の糞便中に広く分布することから<sup>8-13)</sup>, ヒトへの感染はこれら動物との接触あるいは糞便で汚染された食品を介して起こるものと推測されているが, その疫学はなお不明の点が多い。私共も本菌感染症の疫学的解明を目的に各種動物における分布状況を調べ, カンピロバクターが一部の実験動物を除き, 家畜・家禽, 愛玩動物, 野生動物等の間に広く分布していることを確認した<sup>14-16)</sup>。

ところで, ヒトに本菌感染症あるいは食中毒が発生した場合, その防疫のため感染源あるいは汚染源の追究が行われるが, 上述の如く本菌が各種動物糞便から容易に分離されることなどから, 折角疑わしい菌が分離されても, その因果関係を立証することは困難で, 僅かに分離株間の血清学的性状の異同による解析が行われているに過ぎない<sup>7)</sup>。

私共は今回, 各種動物から分離した株について, 菌の持つ疫学マーカーの1つにもなる薬剤耐性について調べてみた。特に最近, 感染症の流行時に分離株間の異同をプラスミドプロファイルを用いて解析することが試みられている<sup>17)</sup>ことから, 薬剤耐性とプラスミドの関連に視点をおき調査した。ヒトの臨床例由来株についての薬剤感受性試験は, 治療との関連で多くなされているが<sup>18-20)</sup>, 動物由来株については少なく<sup>21)</sup>, わが国では伊藤ら<sup>22)</sup>や Kaneuchi ら<sup>23)</sup>の報告をみるに過ぎない。さらに, プラスミドとの関連で解析したのは, わが国ではヒト臨床例由来株で TC 耐性が50あるいは45Mdal プラスミドに支配されていることを指摘した Sagara ら<sup>24)</sup>の報告だけで, 動物由来株については不明である。

今回の実験で, 薬剤耐性がある特定のプラスミドに支配されるという明確なデータは得られなかったが, その可能性は示された。また, 下痢が持続した同一集団のサルから分離した株の薬剤耐性パターンとプラスミドプロファイルが同一であるなど, これらが疫学マーカーの1つとして充分使用できることが示唆された。

## 実験材料及び方法

使用菌株: 試験に供したカンピロバクター菌株は, 当研究室で分離, 同定されたサル由来103株, ネズミ

由来15株, ニワトリ由来6株, イヌ由来4株及びハト由来2株の計130株である<sup>14-16)</sup>。なお, 130株中93株は *C. jejuni*, 36株は *C. coli* で, 残り1株が *C. fetus* である。接合伝達試験の受容菌としてナリジキシン酸 (NA)耐性の *C. fetus* C-607株<sup>24)</sup>(東京医科歯科大学の中谷林太郎教授より分与)と *E. coli* K-12 ML1410株を用いた。その他, プラスミド解析の際の分子量マーカー用菌株として *E. coli* V-517株(帝京大学医学部杉山芳宏博士より分与)を使用した。

薬剤感受性試験: 供試した抗菌性物質は TC, SM, KM, APC, CP 及び NA の6剤である。感受性試験は寒天平板希釈法によった<sup>25)</sup>。すなわち, 被検菌をハートインフュージョン (HI) ブイヨンで37°C, 48時間微好気的条件下で培養し, これを予め薬剤濃度が25µg/mlになるように作成した HI寒天培地あるいは感受性ディスク培地上にマルチノキュレーターで接種し, 37°C 48時間微好気培養を行った。菌集落形成をみた株を薬剤耐性株と判定した。

接合伝達試験: 薬剤耐性株を供与菌とし, *C. fetus* C607株及び *E. coli* K-12ML1410株を受容菌として常法に従って薬剤耐性の伝達試験を行った<sup>25)</sup>。

プラスミドの検索: プラスミド DNA の分離を Kado と Liu の方法<sup>26)</sup>あるいは Birnboim と Doly の方法<sup>27,28)</sup>で行った。分離 DNA については, アガロースゲル電気泳動により解析した<sup>28)</sup>。ゲル濃度は0.7~1.0%とし, 泳動はミューピッド2泳動装置(丸善石油バイオケミカル)を用い, 電圧50V で約1.5時間行った。泳動終了後, エチジウムブロマイドで染色し, 紫外線ランプで観察し, Polaroid MP4 Land Camera で撮影した。

## 実験成績

### 1. 薬剤耐性株の検出率

各種動物由来130株の6種の抗菌性物質に対する耐性株の検出率は Table 1. に示す通りである。なお, NA に対しては全株が感受性であり, 特に表示しなかった。以後 NA を除く5種の抗生物質に関する成績のみ記載する。何れかの薬剤に耐性を示す株が45株34.6%確認された。動物由来別では, サル以外の動物からの被検株が少ないため比較は困難であるが, 耐性株の検出率はニワトリ由来株で66.7%と最も高率で, 次いでネズミ由来株で53.3%, サル由来株の32.0%の順で, イヌ及びハト由来株では検出できなかった。

次に薬剤別に検出率を比較すると, TC 耐性株が最も多く21.5%で, 次いで KM, SM, APC 耐性株の順で, CP 耐性株は全く検出されなかった。TC 耐性株はサル, ネズミ及びニワトリ由来株の何れの場合も最も多く検出されているが, サル由来株ではその他 KM 耐性株が, またネズミ由来株では SM 耐性株がそれぞれ TC 耐性株の検出率と近い値で検出されている。なお, 表示しなかったが, 耐性株45株の中に2剤耐性株6株 (TC-SM 3株; KM-APC 2株; KM-SM 1株)と3剤耐性株1株 (TC-KM-SM) の計7株の多剤耐性株があった。これら7株の由来は3株がサル, 3剤耐性の1株を含む4株がネズミ由来株であった。

一方, カンピロバクターの菌種別に耐性株の検出率を比較すると, Table 2 のように *C. jejuni* の31.2%

Table 1. Susceptibility of Campylobacters from animals against 5 antibiotics\*

Animal species	No. of strains		No. of resistant strain (%) against				
	tested	resistance (%)	TC	KM	SM	APC	CP
monkey	103	33(32.0)	18(17.5)	15(14.6)	1(1)	2(1.9)	0
rat	15	8(53.3)	6(40)	2(13.3)	5(33.3)	0	0
chicken	6	4(66.7)	4(66.7)	0	0	0	0
dog	4	0 (0)	0	0	0	0	0
pigeon	2	0 (0)	0	0	0	0	0
Total	130	45(34.6)	28(21.5)	17(13.1)	6(4.6)	2(1.5)	0

\*TC, tetracycline ; KM, kanamycine ; SM, streptomycine ; APC, ampicillin ; CP, chloramphenicol.

Table 2. Susceptibility of *Campylobacter* species to 5 antibiotics

Species	No. of strains		No. of resistant strains (%) to				
	tested	resistance (%)	TC	KM	SM	APC	CP
<i>C. jejuni</i>	93	29(31.2)	25(26.9)	3(4.3)	2(2.2)	1(1.1)	0
<i>C. coli</i>	36	16(44.4)	3(8.3)	14(38.9)	4(11.1)	1(2.8)	0
<i>C. fetus</i>	1	0	0	0	0	0	0
Total	130	45(34.6)	28(21.5)	17(13.1)	5(4.6)	2(1.5)	0

Table 3. Plasmid occurring rates in *Campylobacter* from animals

Animal species	No. of strains		No. of plasmids per strain				
	tested	with plasmids (%)	1	2	3	4	5
monkey	103	56(54.4)	25	16	11	3	1
rat	15	10(66.7)	2	4	3	1	0
chicken	6	5(83.3)	0	2	3	0	0
dog	4	2(50.0)	2	0	0	0	0
pigeon	2	2(100)	1	0	1	0	0
Total	130	75(57.7)	30	22	18	4	1

### 3. プラスミドの検出

被検菌130株について DNA を分離し、アガロースゲル電気泳動によりプラスミドの検索を行ったところ、うち75株(57.7%)からプラスミドが検出された (Table 3)。プラスミドの検出率を由来動物別にみると、ハト由来株で被検株数は少ないが100% (2/2) と最も高率で、次いでニワトリ、ネズミ、サル及びイヌ由来株の順で、株の由来を問わず50%以上と高率にプラスミドを保有していることがわかった。また、1株当たりのプラスミドの個数も1個のみ有する株が多かったが、2~5個保有する株も確認された。Figure 1. にサル由来株のプラスミド DNA の電気泳動像の一部を示した。検出されたプラスミド DNA の分子量は1.2~360Mdalで、特に5 Mdal以下の小さなものが62株(82.7%)に認められたが、由来動物や本菌全般に共通する一定の大きさのものはみられなかった。

### 4. 薬剤耐性とプラスミド

薬剤耐性株45株と感受性株85株の間でプラスミドの保有状況に差があるか否か、さらにある特定の大きさのプラスミドがある薬剤の耐性と係わりがあるか否かを調べた。その結果、Table 4 及び5に示すように、*C. jejuni* と *C. coli* の両菌種とも、またサル、ネズミ及びニワトリのどの由来株でも耐性株のプラスミド保有率が感受性株のそれより高率で、全体では耐性株の86.7%に対し感受性株は42.4%で、両者間に有意差 ( $P < 0.01$ ) があった。Table 6 は耐性株について、薬剤別にプラスミド保有状況をまとめたものであるが、APC 耐性株を除いて各薬剤耐性株ともその80%以上がプラスミドを保有していた。

次に、薬剤耐性株でプラスミドを保有している株について、薬剤耐性がある特定の分子量のプラスミドに規定されているか否かを調べるために、TC 耐性株24株、KM 耐性株15株及び SM 耐性株5株を対象に、それぞれ検出されたプラスミド DNA の分子量を示し、Table 7 にまとめた。TC 耐性株では24株中14株から41Mdal、7株から72Mdal、6株から3 Mdal プラスミドが検出されるなど、一部の株間に共通するものがあつたが、TC 耐性の全株に共通する大きさのプラスミドは確認できなかった (Figure 1)。KM 耐性株では15株中7株から4.2Mdal、6株から2.6Mdal、5株から10Mdal のプラスミドが検出されるなど一部

に比し、*C. coli* の44.4%が僅かに高率であった。また、*C. jejuni* では TC 耐性株が多く26.9%を占めたのに対し、*C. coli* では KM 耐性株が38.9%を占め、両菌種間に耐性パターンに差がみられた。

### 2. 薬剤耐性の接合伝達試験

薬剤耐性を示した45株について、受容菌に *E. coli* K-12ML1410株と *C. fetus* C607株の両菌種を用いて常法で伝達性 R プラスミドの検索を行ったが、何れの場合もこの方法では伝達性 R プラスミドを確認することはできなかった。

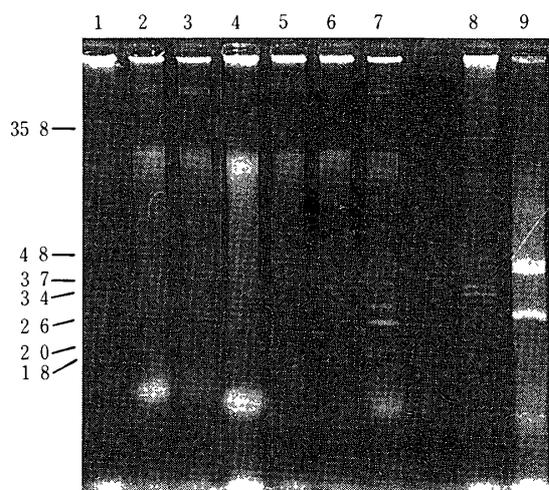


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA from *Campylobacter* isolates from monkeys

Lanes : 1, V517 (molecular weight standard); 2, Mc12; 3, Mc22 ; 4, Mc29; 5, Mc33; 6, Mc66; 7, Mc80; 8, V517 and 9, Mc 47.

Numbers at the side indicate the molecular sizes in Mdal. Characters of the strains used were shown in table 7.

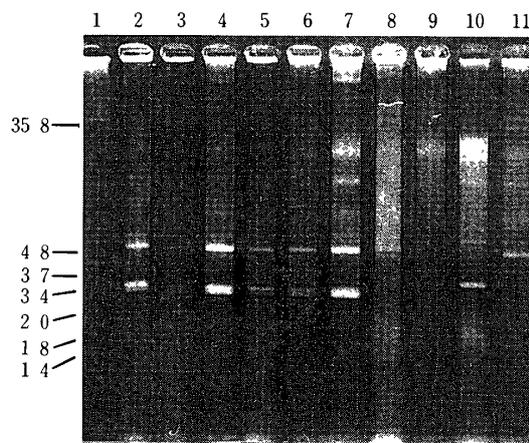


Figure 2. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNA from strains of *Campylobacters* isolated from monkeys reared as a small number of group in indoor pen.

Lanes : 1, V517 (molecular weight standard); 2, Mc 40; 3, Mc 43; 4, Mc44; 5, Mc45; 6, Mc46; 7, Mc47; 8, Mc48; 9, Mc49; 10, Mc50 and 11, Mc51.

Table 4. Plasmid occurring rates in drug resistant and susceptible strains of *Campylobacter* species

Species	Resistant strains		Susceptible strains		Total	
	No. tested	No. (%) with plasmids	No. tested	No. (%) with plasmids	No. tested	No. (%) with plasmids
<i>C. jejuni</i>	29	26(89.7)	64	28(43.8)	93	54(58.1)
<i>C. coli</i>	16	13(81.2)	20	7(35.0)	36	20(55.6)
<i>C. fetus</i>	0	0	1	1(100)	1	1(100)
Total	45	39(86.7)	85	36(42.4)	130	75(57.7)

Table 5. Plasmid occurring rates in drug resistant and susceptible strains of *Campylobacters* from animals

Animal species	Resistant strains		Susceptible strains	
	No. tested	No. (%) with plasmids	No. tested	No. (%) with Plasmids
monkey	33	28(84.8)	70	28(40.0)
rat	8	7(87.5)	7	3(42.9)
chicken	4	4(100)	2	1(50.0)
dog	0	0	4	2(50.0)
pigeon	0	0	2	2(100)
Total	45	39(86.7)	85	36(42.4)

Table 6. Plasmid occurring rates in drug resistant strains by antibiotics

Antibiotics	No. of strains tested	No. of strains with plasmids (%)
TC	28	24(85.7)
KM	17	15(88.2)
SM	6	5(83.3)
APC	2	0
Total	45*	39(86.7)

\* Include 6 double and 1 triple drug resistant strains.

Table 7. drug resistance patterns and plasmids

Strain	Species	Resistance to			Plasmid size (Mdal)			
		TC	KM	SM				
Rc 156*	<i>C. coli</i>	+	+	+	41	19	2.8	1.2
Rc 152*	<i>C. coli</i>	+	-	+	41	19	2.8	1.2
Rc 159*	<i>C. coli</i>	+	-	+	72	41		
Mc 12	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	360			
Mc 22	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	360			
Mc 33	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	41		2.8	2.3
Mc 52	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	41		3.4	2.3
Mc 56	<i>C. jejuni</i>	+	-	-				2.3
Mc 79	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	41			
Mc 80	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	360		3.4	2.3
Mc 88	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	110		3.4	
Mc 96	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	41			3
Mc 100	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	110		6 4.3 3.9 3.4	
Mc 101	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	41	30		3
Mc 102	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	41	30		3
Mc 103	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	72			
Mc 104	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	72			3
Mc 105	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	72			3
Rc 7	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	41			3
Rc 8	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	41			3
Cc 2	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	72	22		
Cc 3	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	41	17		
Cc 4	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	72	41	22	
Cc 6	<i>C. jejuni</i>	+	-	-	72	41	22	
Mc 156*	<i>C. coli</i>	+	+	+	41	19	2.8	1.2
Rc 10	<i>C. coli</i>	-	+	+			2.4	
Mc 40	<i>C. coli</i>	-	+	-		10 4.2	2.6	
Mc 43	<i>C. coli</i>	-	+	-		4.2	2.6	
Mc 44	<i>C. coli</i>	-	+	-		10 4.2	2.6	
Mc 45	<i>C. coli</i>	-	+	-		4.2	2.6	
Mc 46	<i>C. coli</i>	-	+	-		10 4.2	2.6	
Mc 47	<i>C. coli</i>	-	+	-		10 4.2	2.6	
Mc 48	<i>C. jejuni</i>	-	+	-		4.2		
Mc 51	<i>C. coli</i>	-	+	-	60 40	10	3.7	
Mc 53	<i>C. coli</i>	-	+	-			3.4	
Mc 54	<i>C. coli</i>	-	+	-				2.2
Mc 55	<i>C. coli</i>	-	+	-				2.2
Mc 57	<i>C. jejuni</i>	-	+	-				2.2
Mc 59	<i>C. jejuni</i>	-	+	-				2.2
Rc 156*	<i>C. coli</i>	+	+	+	41	19	2.8	1.2
Rc 152*	<i>C. coli</i>	+	-	+	41	19	2.8	1.2
Rc 159*	<i>C. jejuni</i>	+	-	+	72	41		
Rc 10	<i>C. coli</i>	-	+	+			2.4	
Rc 9	<i>C. jejuni</i>	-	-	+			2.4	

Rc, rat isolates ; Mc, monkey isolates ; Cc, chicken isolates.

\*Multiple resistant strains were repeatedly listed in corresponding columns.

に共通のものもあったが、TC の場合同様全株に共通するものはなかった。SM 耐性株 5 株ではうち 4 株が他の薬剤との多剤耐性株であるため解析はできないが、SM 単剤耐性の 1 株のそれは 2.4Mdal であった。

#### 5. 疫学マーカーとしてのプラスミド

屋内で 10 数頭規模で群飼育され、カンピロバクターが原因と思われる下痢が持続したヤクニホンザルの 1 群について排泄した個体が異なるとされる 6 つの糞便より分離したカンピロバクターと 47 日後に同様 4 つの糞便より分離したその薬剤耐性とプラスミドを比較検討した。その結果、Figure 2 と一部 Table 7 に示してある如く、初回の 6 糞便由来の株 (Mc40, 43, 44, 45, 46 及び 47) は何れも KM 耐性の *C. coli* で、そのプラスミドプロフィールも殆んど同じであった。しかし、2 回目に分離したもののうち Mc48 と 50 は *C. jejuni* で、異なった菌種も混在しており、プラスミドも一部共通するものがみられるが、一致してなかった。

### 考 察

カンピロバクターの薬剤感受性試験については、ヒト臨床例由来株では本菌感染症の治療との関連で多くの報告がある<sup>18-20)</sup>。今回、動物由来 130 株について常用される TC, KM, SM, APC 及び CP の 5 種の抗生物質に対する感受性を調べたが、その成績はヒト由来のそれとほぼ類似していた。すなわち、薬剤耐性株は全体で 34.6% あり、うち TC 耐性株が最も多く分離され 21.1% を占めた。TC に次いで KM (13.1%)、SM (4.6%) 及び APC (1.5%) 耐性株の順で検出されたが、CP 耐性株は全く検出できなかった。ヒト由来株でも TC 耐性株が優位を占め 8 ~ 55% の範囲で報告されている<sup>19,20)</sup>。Kaneuchi ら<sup>23)</sup>もイヌ、ネコ及びブタ由来の *C. jejuni* 及び *C. coli* で TC 耐性株が多く 19 ~ 28% を占めたと報告している。一方、菌種別に耐性菌の検出状況を比較すると、*C. jejuni* で 31.2% が耐性で、その中で TC 耐性株が 26.9% と 1 位を占めたのに対し *C. coli* では 44.4% が耐性で、このうち KM 耐性株が多く 36.1% を占め、両菌種の間で差がみられた。この差は菌種による本質的な差でなく、たまたま KM 耐性 *C. coli* があるサル集団から集中的に分離されたことによるものかも知れない。しかし、Kaneuchi ら<sup>23)</sup>もブタ由来 *C. coli* で KM 耐性株を TC 耐性株同様高率に検出している。なお、彼らは SM 耐性株も同程度に検出している。

さて、このような薬剤感受性試験の成績をもとにプラスミドとの関連を調べてみた。まず、130 株全株についてプラスミドの有無を調べたところ、うち 75 株 57.7% から検出され、使用した菌株数が充分でなかったが、サル、ネズミ、イヌ及びニワトリなど由来動物種を問わず 50% 以上の検出率であった。本菌のプラスミドの検出率については 11.2 ~ 61.3%<sup>20,21,29-32)</sup> と研究者によりまちまちであるが、その中で Bradbury と Munroe<sup>21)</sup>は動物由来株 52 株を含む計 200 株について解析し、うち 116 株 53% がプラスミド保有株であったと報告としている。また、1 菌株当たりのプラスミドの保有状況も今回の成績同様 5 個同時に有する株もみられている。これらの報告から、動物由来株もヒト由来株同様高率にプラスミドを保有しているといえよう。今回検出したプラスミドの分子量については、1.2 ~ 360Mdal と広範にわたったがその中で 5 Mdal 以下の小さいプラスミドを保有するものが 80% 以上を占めた。一方、100Mdal 以上の大きなプラスミドも 10.7% の株にみられた。しかし、本菌全般に共通する一定の大きさのものは確認できなかった。このプラスミドの大きさについては Bradbury らが、1.6 ~ 70Mdal<sup>33)</sup> と 1 ~ 86Mdal<sup>21)</sup>、Tenover らが、1.2 ~ 97.2Mdal<sup>32)</sup> と報告しているが、今回私共が検出した 360Mdal という大きなものは報告されていない。

次に、これらの成績を薬剤耐性株と感受性株に分けて検討してみた。その結果、薬剤耐性株 45 株ではプラスミド保有率が 86.7% に対し、感受性株では 42.4% で、明らかに耐性株にプラスミド保有株の多いことがわかった ( $P < 0.01$ )。同様の傾向は *C. jejuni* と *C. coli* 両菌種でも、またどの動物由来株でも認められた。Sagara ら<sup>24)</sup>は 121 株について調べ、うち 55% が TC 耐性であり、TC 耐性株の 82% が、また TC 感受性株の 15% がプラスミドを保有していたなど、今回の成績と類似の結果を報告している。薬剤耐性株について、薬剤別にプラスミド保有状況を比較すると、この場合 TC, KM 及び SM 耐性株が何れも差なく 80% 以上と高率にプラスミドを保有していた。

次に、薬剤耐性株でしかもプラスミドが確認された株について、プラスミドに共通の分子量のものがあ

るかを調べてみた。その結果、薬剤別に耐性株すべてに共通するプラスミドは確認できなかったが、TC 耐性株の58% (14/24) に41Mdal のプラスミドが検出され、しかもこのプラスミドが、サル、ネズミ、ニワトリなど由来を異にする *C. jejuni* に共通してみられた点が、TC 耐性との関連で興味をひく所見である。カンピロバクターの薬剤耐性とプラスミドに関して、Tenover ら<sup>34)</sup>は114頭のサルを調べ、72頭 (63.2%) から本菌を分離したが、うち25頭由来株 (34.7%) がTC 耐性株で、さらに TC 耐性株中15株についてプラスミド検索を行ったところ、全株が38Mdal のプラスミドを、またうち7株はその他に2.6Mdal のプラスミドも保有していたと述べ、他の薬剤についてはふれていないが、TC 耐性とプラスミド特に38Mdal プラスミドとの関連を示唆している。Bopp ら<sup>20)</sup>は *C. jejuni* 31株を調べ、19株にプラスミドを確認し、うち13株は TC 耐性で、これらの TC 耐性株は何れも38Mdal プラスミドを持っていたと述べている。同様に、Taylor ら<sup>35)</sup>も TC 耐性株3株について38Mdal プラスミドとの関連を伝達試験でも確認している。このように3つの報告で TC 耐性と38Mdal プラスミドの関係が示唆されている。今回私共が行った実験で TC 耐性株の58.3%が保有していた41Mdal のプラスミドは、これらの報告と一致していると思われる。しかし上記と同一著者でありながら、例えば Tenover ら<sup>32)</sup>は *C. jejuni* 628株及び *C. coli*60株についてプラスミド検索を行い、前者の31%、後者の40%が1.2~97.2Mdal のプラスミドを保有していることを確認し、またこれら計688株について薬剤感受性試験も行い、その中で TC 耐性株が最も高率で24% (165株) を占め、これら TC 耐性株がすべてプラスミドを有し、その主体が24と36Mdal プラスミドであったと述べ、前述の38Mdal プラスミドと異なった成績を報告している。また同様、Taylor ら<sup>36)</sup>も TC に高いレベルに耐性を示す株はすべて27-30Mdal プラスミドをもつものであったと述べている。このように TC 耐性とプラスミドの関連が示唆されているが、そのプラスミドの分子量については、必ずしも共通のものは報告されていないように思われる。

薬剤耐性をプラスミドが支配するか否かを直接的に証明する方法としては、プラスミドの接合伝達試験がある。今回、腸内細菌で行われている R プラスミドの検出法で試みたが、全く確認することができなかった。この接合伝達試験については現在いろいろな方法で試みつつあり、すでにトランスコンジュガントの分離にも成功しているので、確認の上追って別報で発表する予定である。

次に、プラスミドプロファイルが本菌感染症流行時の疫学マーカーとなりうるか否かを調べた。たまたま検査時にカンピロバクターが原因と思われる下痢症が流行していたサルの10数頭規模の集団飼育例があり、それらから分離したカンピロバクターについて薬剤耐性とプラスミドプロファイルを比較した。その結果、初回に採取した6検体由来株は何れも *C. coli* の KM 耐性株で、しかもプラスミドプロファイルも同じであった。しかし47日目のそれらには異なった菌種も混在し、プラスミドにも違いがみられ、集団には複数のカンピロバクターの浸淫があることが示唆された。Tenover ら<sup>17)</sup>はヒト集団でのカンピロバクター感染症の3つの流行において、分離株のプラスミドを解析したところ、第1流行例ではプラスミド保有株4株中3株から24.6Mdal プラスミドが、第2流行例では4症例中2症例由来株から16.8と22.8Mdal プラスミドが、また第3流行例は子犬から感染したと思われる1家族の例で、その子犬と3人の子供から18.6, 21及び22.8Mdal プラスミドがそれぞれ共通して検出され、本菌感染症の疫学マーカーとしての使用の可能性を示唆している。この Tenover らの成績と今回の私共の成績から、本菌感染症流行時あるいは食中毒発生時の感染源あるいは汚染源の疫学的検索の際、このプラスミド、特に薬剤耐性と関連づけたプラスミドの解析が疫学マーカーとして使用可能なことが示唆された。今後この面の追試確認もしたい。

## 謝 辞

本研究の一部は京都大学霊長類研究所での共同利用研究によって行った。記して感謝の意を表したい。また、一部は昭和61年度科学研究費一般研究 B No.61480089の補助金によって行われた。

## 文 献

- 1) Skirrow, M. B. : Campylobacter enteritis-the first five years. J. Hyg., Camb. 89 : 175-184, 1982.
- 2) Skirrow, M. B. : Campylobacter enteritis : a "new" disease. Br. Med. J. 2 : 9-11, 1977.

- 3) Butzler, J. P. and Skirrow, M. B. : *Campylobacter enteritis*. Clin. Gastroent. 8 : 737-765, 1979.
- 4) Chowdhury, M. N. H. : *Campylobacter jejuni enteritis*, A review. Trop. Geogr. Med. 36 : 215-222, 1984.
- 5) 町井彰・新田義明・村上義次・相楽裕子・瀬尾威久・松原義雄 : 成人における近年の感染性腸炎の起炎菌と臨床——とくに *Campylobacter jejuni* を中心として——. 感染症学誌 58 : 297-303, 1984.
- 6) 伊藤武 : 感染症サーベランス——カンピロバクター腸炎の発生状況. 医学のあゆみ 135 : 1072-1073, 1985.
- 7) 坂崎利一 : “食中毒” 東京 : 中央法規出版 1983.
- 8) 伊藤武・高橋正樹・斉藤香彦・高野伊知郎・甲斐明美・大橋誠・福山正文・上村和雄 : ニワトリにおけるカンピロバクターの保菌状況ならびに本菌の排菌推移および養鶏場の環境における本菌汚染状況について. 感染症学誌 59 : 86-93, 1985.
- 9) Manser, P. A., and Dalziel, R. W. : A survey of *Campylobacter* in animals. J. Hyg. 95 : 15-21, 1985.
- 10) Banffar, J. R. : Biotypes and serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains isolated from patients, pigs and chickens in the region of Rotterdam. J. Infect. 10 : 277-281, 1985.
- 11) Wright, E. P. : The occurrence of *Campylobacter jejuni* in dogs feces from a public park. J. Hyg. 89 : 191-194, 1982.
- 12) 板屋民子・徳丸雅一・岩崎久夫・池谷奉文・草地恒太 : ペット動物と野鳥の *Campylobacter jejuni / coli* 分布状況調査. 日獣会誌 38 : 362-367, 1985.
- 13) Fukuyama, M., Kamimura, T., Itoh, T., Saito, K., Takahashi, S., Sakai, S., Murata, M., Kohzaki, K., Hara, M., Shimizu, T. and Tabuchi, K. : Distribution of *Campylobacter jejuni* in wild birds and serogroup of isolates by agglutination technique. Jpn. J. Vet. Sci. 48 : 487-493, 1986.
- 14) Kinjo, T., Morishige, M., Minamoto, N. and Fukushi, H. : Prevalence of *Campylobacter jejuni* in feral pigeons. Jpn. J. Vet. Sci. 45 : 833-835, 1983.
- 15) 金城俊夫・坂井智恵・市川隆・源宣之・松林伸子・松林清明 : サルの糞便からのカンピロバクターの分離. 岐阜大農研報(51) : 207-217, 1986.
- 16) 坂井智恵・金城俊夫・源宣久 : 各種動物からのカンピロバクターの分離. 岐阜大農研報(52) : 217-222, 1987.
- 17) Tenover, F. C., Williams, S., Gordon, K. P., Harris, N., Nolan, C., and Plorde, J. J. : Utility of plasmid fingerprinting for epidemiological studies of *Campylobacter jejuni* infection. J. Infect. Dis. 149 : 279, 1984.
- 18) Vanhoff, R., Gorts, B., Dierickx, R., Coignau, H., and Butzler, J. P. Bacteriostatic and bactericidal activities of 24 antimicrobial agents against *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*. Antimicrob. Agents Chemother. 18 : 118-121, 1980.
- 19) Michel, J., Rogol, M., and Dickman, D. : Susceptibility of clinical isolates of *Campylobacter jejuni* to sixteen antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. 23 : 796-797, 1983.
- 20) Bopp, C. A., Birkness, K. A., Wachsmuth, I. K., and Barrett, T. I. In vitro antimicrobial susceptibility, plasmid analysis, and serotyping of epidemic-associated *Campylobacter jejuni*. J. Clin. Microbiol. 21 : 4-7, 1985.
- 21) Bradbury, W. C. and Munroe, D. L. G. : Occurrence of plasmids and antibiotic resistance among *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from healthy and diarrheic animals. J. Clin. Microbiol. 22 : 339-346, 1985.
- 22) 伊藤武・高橋正樹・甲斐明美・高野伊知郎・斉藤香彦・大橋誠 : ヒト及び各種動物から分離された *Campylobacter jejuni* 及び *Campylobacter coli* の抗生物質感受性の比較. 感染症学誌 58 : 1206-1212, 1984.
- 23) Kaneuchi, C., Ashihara, M., Sugiyama, Y. and Imaizumi, T. : Antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter laridis* from cats, dogs, pigs, and seagulls. Jpn. J. Vet. Sci. 50 : 685-691, 1988.
- 24) Sagara, H., Mochizuki, A., Okamura, N., and Nakaya, R. : Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* with special reference to plasmid profiles of Japanese clinical isolates. Antimicrob. Agents Chemother. 31 : 713-719, 1987.
- 25) 大前憲一 : 薬剤感受性試験とRプラスミドの検査法. 日獣会誌 35 : 662-666, 1982.
- 26) Kado, C. I. and Liu, S. T. : Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J. Bacteriol. 145 : 1365-1373, 1981.
- 27) Birnboim, H. C., and Doly, J. : A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acid Res. 7 : 1513-1523, 1979.

- 28) 高木康敬 : “遺伝子操作マニュアル” 東京 : 講談社 1982.
- 29) Ambrosio, R. E., and Lastovica, A. J. : Rapid screening procedure for detection of plasmids in *Campylobacter*. *S. Afr. J. Sci.* **79** : 110-111, 1983.
- 30) Austen, R. A. and Trust, T. J. : Detection of plasmids in the related group of the genus *Campylobacter*. *FEBS Lett.* **8** : 201-202, 1980.
- 31) Marri, L., Musmanno, R. A., Coratza, G., Figura, N., and Molina, A. M. Does the occurrence of plasmids in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated correlate with antibiotic resistance? *Eur. J. Clin. Microbiol.* **3** : 446-447, 1984.
- 32) Tenover, F. C., Williams, S., Gordon, K. P., Nolan, C., and James, J. P. : Survey of plasmids and resistance factors in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27** : 37-41, 1985.
- 33) Bradbury, W. C., Marco, M. A., Hennessy, J., and Penner, J. L. : Occurrence of plasmid DNA in serologically defined strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Infect. Immun.* **40** : 460-463, 1983.
- 34) Tenover, F. C., Brondson, M. A., and Plorde, J. J. : Isolation of plasmids encoding tetracycline resistance from *Campylobacter jejuni* strains isolated from simians. *Antimicrob. Agents Chemother.* **23** : 320-322, 1983.
- 35) Taylor, D. R., Garner, R. S., and Allan, B. J. : Characterization of tetracycline resistance plasmids from *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **24** : 930-935, 1983.
- 36) Taylor, D. E., Chang, N., Garner, R. S., and Sherburne, R. : Incidence of antibiotic resistance and characterization of plasmids in *Campylobacter jejuni* strains from clinical sources in Alberta, Canada. *Can. J. Microbiol.* **32** : 28-32, 1986.