

[報文]

## 薬剤耐性細菌の放射線殺菌効果

伊藤 均

元日本原子力研究所高崎研究所

(現独立行政法人農業食品産業総合研究機構食品総合研究所) (〒 370-0884 群馬県高崎市八幡町 935-6)

## Effect of radiation decontamination on drug-resistant bacteria

Hitoshi ITO

formerly Takasaki Radiation Chemistry Research Establishment, Japan Atomic Energy Research Institute,  
Yahata-machi 935-6, Takasaki, Gunma 370-0884 Japan

### Summary

More than 80% of food poisoning bacteria such as *Salmonella* are reported as antibiotic-resistant to at least one type antibiotic, and more than 50% as resistant to two or more. For the decontamination of food poisoning bacteria in foods, radiation resistibility on drug-resistant bacteria were investigated compared with drug-sensitive bacteria. Possibility on induction of drug-resistant mutation by radiation treatment was also investigated. For these studies, type strains of *Escherichia coli* S2, *Salmonella enteritidis* YK-2 and *Staphylococcus aureus* H12 were used to induce drug-resistant strains with penicillin G. From the study of radiation sensitivity on the drug-resistant strain induced from *E. coli* S2,  $D_{10}$  value was obtained to be 0.20 kGy compared with 0.25 kGy at parent strain. On *S. enteritidis* YK-2,  $D_{10}$  value was obtained to be 0.14 kGy at drug-resistant strain compared with 0.16 kGy at parent strain.  $D_{10}$  value was also obtained to be 0.15 kGy at drug-resistant strain compared with 0.21 kGy at parent strain of *St. aureus* H12. Many isolates of *E. coli* O157:H7 or other type of *E. coli* from meats such as beef were resistant to penicillin G, and looked to be no relationship on radiation resistivities between drug-resistant strains and sensitive strains. On the study of radiation sensitivity on *E. coli* S2 at plate agars containing antibiotics, higher survival fractions were obtained at higher doses compared with normal plate agar. The reason of higher survival fractions at higher doses on plate agar containing antibiotics should be recovery of high rate of injured cells by the relay of cell division, and drug-resistant strains by mutation are hardly induced by irradiation.

**Key words:** drug-resistant bacteria, radiation-sensitivity, radiation decontamination, food poisoning, pathogenic microorganisms

### はじめに

米国では食肉汚染 *Salmonella* の80%以上が薬剤耐性菌であり、さらに50%以上が多剤耐性菌であると報告されている<sup>1)3)</sup>。わが国の場合にも *Salmonella* の多くが薬剤耐性菌であると報告されている<sup>4)</sup>。*Salmonella* 等の薬剤耐性菌が蔓延しているということは食中毒患者の抗生物質による治療が困難になる

ことを意味しており、食肉等の殺菌処理が必要なことを示している。そして、固体食品の殺菌処理法としては放射線処理がすぐれている。しかし、薬剤耐性菌と非耐性菌の放射線感受性が同じかどうかとか照射後の生残菌に薬剤耐性菌が増加するかどうかはほとんど研究されていない。一方、微生物の放射線抵抗性が照射によって増大しないことについては *Salmonella typhimurium* の繰り返し照射によって明

らかになっている<sup>5)</sup>。これまで薬剤耐性菌の放射線感受性は非耐性菌と同じと見なされてきているが、微生物学的安全性の観点からは薬剤耐性菌の放射線抵抗性が非耐性菌に比べ増大するかどうかと放射線後に生残している菌が突然変異によって薬剤耐性になるかどうかを明らかにしておく必要がある。

本研究では *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Staphylococcus aureus* の標準株を用いて薬剤耐性株を誘導し、放射線感受性を非耐性株と比較すると共に突然変異による薬剤耐性菌誘導能について検討した。また、牛肉等から分離した<sup>6)</sup> *E. coli* O157:H7 等の薬剤耐性と放射線感受性について検討した。

## 実験方法

### 1. 供試菌株

供試菌株は下水汚泥から分離した *E. coli* S2 株と標準菌株の *S. enteritidis* YK-2 株, *St. aureus* H12 株を用いた。また、牛肉等から分離した *E. coli* O157:H7 等の株<sup>6)</sup> も比較に用いた。

### 2. 薬剤耐性株の誘導

薬剤耐性株は *E. coli* S2 株, *S. enteritidis* YK-2 株, *St. aureus* H12 株を 10～1000 unit の濃度のペニシリン含有 Tryptic soy agar 平板培地にペニシリン濃度を増加しながら繰り返し接種し誘導した。得られた耐性株はクロラムフェニコールおよびストレプトマイシンに対する耐性についても比較した。

### 3. 放射線感受性

各菌株の定常期細胞を遠心分離・洗浄してから 0.067M 磷酸緩衝液に懸濁してパイレックス試験管

に各 1.2ml 分注し、溶存空気平衡下で 0～1.2kGy のガンマ線を照射して Tryptic soy agar 平板培地で生残菌数を測定して生存率を求めた。ガンマ線照射は日本原子力研究所高崎研究所の 10 万キュリーコバルト-60 線源を用い、照射位置の線量率の測定はフリッケ鉄線量計とアラニン線量計で行い、線量率が両線量計で一致していることを確認しておいた。

## 実験結果および考察

*E. coli* S2 株と *S. enteritidis* YK-2 株をペニシリン G 濃度を 100～1000 unit に変えて植え継ぐと薬剤耐性の *E. coli* S2-R 株と *S. enteritidis* YK-2R 株が得られた。これらの株は Table 1 に示すようにクロラムフェニコールにも耐性となったが、ストレプトマイシンに対しては親株と差が認められなかった。*St. aureus* H12 株はペニシリン G に対し著しく感受性であり 10 unit でも菌の増殖が困難であったが、H12-R 株はペニシリン G 10 unit で耐性が認められ、クロラムフェニコールにも耐性が若干認められた。

これらの菌株の放射線感受性を比較したところ、薬剤耐性株は親株より放射線抵抗性が弱い傾向が認められた。すなわち、親株の *E. coli* S2 株の  $D_{10}$  値が 0.25kGy であるのに対し、薬剤耐性 S2-R 株の  $D_{10}$  値は 0.20kGy であった。また、*S. enteritidis* の場合も Fig. 1 に示すように親株の YK-2 株の  $D_{10}$  値が 0.16kGy であるのに対し YK-2R 株は 0.14kGy であった。*St. aureus* でも親株の H12 株の  $D_{10}$  値が 0.21kGy であるのに対し H12-R 株は 0.15kGy であった。一方、牛肉等から分離した<sup>6)</sup> 野生の *E. coli* O157:H7 分離株や他

Table 1 Growth of drug-resistant strains on plate agars containing different concentration of antibiotics.

Strain	Penicillin G			Chloramphenicol	Streptomycin
	10 unit	500 unit	1000 unit	10 mg/L	100 mg/L
<i>E. coli</i> S2	+++	+++	+	±	+++
S2-R	+++	+++	+++	+++	+++
<i>S. enteritidis</i>					
YK-2	+++	±	—	+	++
YK-2R	+++	+++	+++	+++	++
<i>St. aureus</i>					
H12	±	—	—	—	++
H12-R	+++	—	—	+	++

+++ ; abundant growth, ++ ; moderate growth, + ; scanty growth, ± ; growth or not, — ; not growth

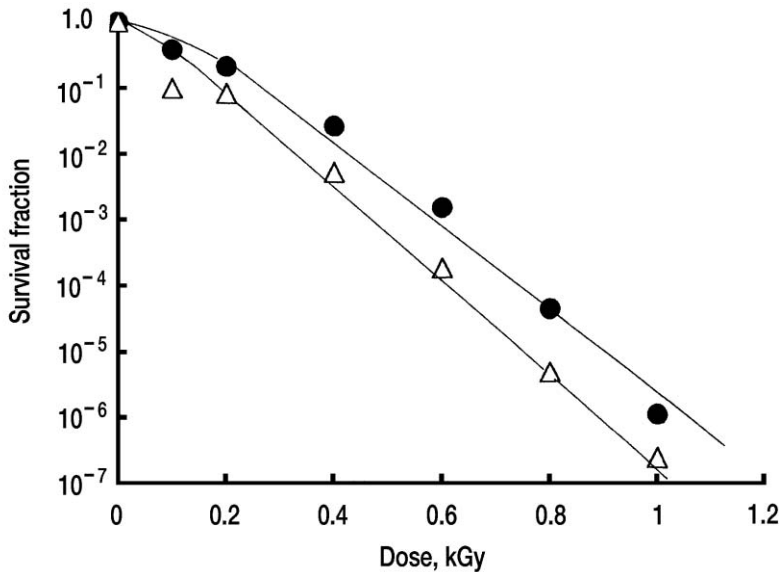


Fig. 1 Comparative sensitivities of *S. enteritidis* YK-2 and YK-2R to gamma irradiation under air-equilibrium.

● : YK-2, △ : YK-2R

の *E. coli* 分離株の多くは Table 2 に示すようにペニシリン G に対し耐性を示したが、放射線感受性との相関性は明確には認められなかった。しかし、一般の *E. coli* 分離株に比べて O157:H7 分離株は放射線抵抗性が著しく弱かった。

つぎに、ペニシリン G を 1000 unit 含む Tryptic soy agar 平板培地とクロラムフェニコール 5 mg/L 含む Tryptic soy agar 平板培地上で *E. coli* S2 株の放射線感受性を調べたところ、ペニシリン含有培地の低線量域では抗生物質無添加培地に比べ S2-R 株と同じような高い感受性を示した。しかし、Fig. 2 に

示すように高線量域での抗生物質含有培地での生存曲線は抗生物質を含まない培地に比べ高い生存率を示した。一方、抗生物質を含まない Tryptic soy agar 平板培地の 0.4kGy または 0.8kGy で生残していたコロニー 32 株の抗生物質耐性を調べると Table 3 に示すように著しい差は認められなかったが、線量の増加と共に抗生物質耐性菌の比率が増加する傾向が認められた。そして、この差は培養日数が長くなると少なくなる傾向が認められた。さらに、1.2kGy 照射したクロラムフェニコール含有培地に生残していたコロニー 16 株についてペニシリン G 耐性を調べ

Table 2 Resistibility to penicillin G and radiation sensitivities ( $D_{10}$ ) on wild strains of *E. coli*.

Isolate	Growth on penicillin G 500 unit	$D_{10}$ value (kGy)
A4-1	—	0.06
A4-2 (O157 ; H7)	+++	0.06
C1 (O157 ; H7)	+++	0.06
B4	+++	0.23
CL1-2	±	0.15
S2	+++	0.26
IID959 (O157 ; H7)	—	0.12

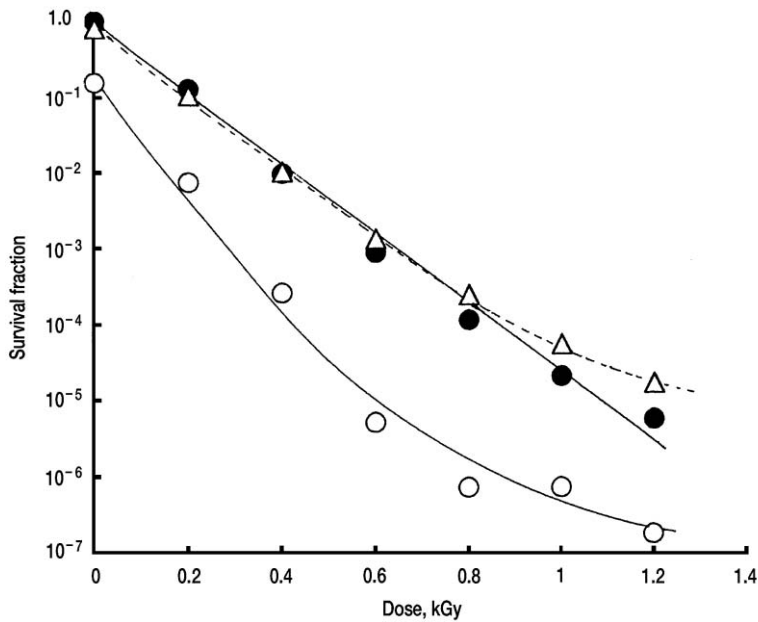


Fig. 2 Radiation sensitivities of *E. coli* S2 on plates of Tryptic soy agar, 5 mg/L of chloramphenicol agar and 1000 unit of penicillin G agar.

- : Tryptic soy agar plates,
- △ : 5 mg of chloramphenicol agar plates,
- : 1000 unit of penicillin G agar plates

Table 3 Growth rate of 32 isolates on antibiotics agar plates after irradiation of *E. coli* S2 on Tryptic soy agar plates.

Antibiotic agar plate	non-irrad.	0.4kGy	0.8kGy
Penicillin G, 500 unit			
Incubation for 1 day	100%	100%	100%
Penicillin G, 1000 unit			
Incubation for 1 day	25%	87%	94%
Incubation for 2 days	85%	100%	100%
Chloramphenicol, 10mg/L			
Incubation for 1 day	3%	6%	16%
Incubation for 2 days	100%	100%	100%

\* 11 of 16 isolates from 1.2kGy chloramphenicol agar grow at 1000 unit penicillin agar.

たところ、11株は1000 unitでの増殖が認められたが、5株は増殖しなかった。このことは、抗生物質含有培地での生存曲線が高線量域で放射線に抵抗性を示したのは突然変異によるものではなく抗生物質による細胞分裂遅延効果によって放射線損傷が回復しやすくなったことが原因していると思われる<sup>7)</sup>。

細菌の抗生物質に対する耐性は本研究の結果でも簡単に誘発されることが明らかで、野生の *E. coli* 分離株でも薬剤耐性株が多く分布していることが示された。ことに、野生の *E. coli* O157:H7 分離株が薬剤耐性菌であることは食品衛生上問題と思われる。本研究との関連で行った薬剤耐性の野生 *Pseudomonas*

*aeruginosa* のプラスミド転移が *E. coli* に対し簡単に起こった<sup>8)</sup>ことは菌縁がより近い関係にある *Salmonella* と *E. coli* 間では薬剤耐性プラスミドの転移が容易に起こることを示している。食肉等は十分な加熱調理を行えば食中毒性薬剤耐性菌の汚染はそれほど問題とならないであろうが、100℃程度の短時間加熱では食品中に熱が十分行き渡らず、90℃以下の加熱では菌が生残することがある。また、生の食肉等の薬剤耐性病原菌がまな板などを通じて他の食品に汚染することも考えられる。一方、*E. coli* の中には10℃でも活発に増殖するものもあるため<sup>6),9)</sup>、冷蔵庫の過信は問題であろう。このことは店頭に出荷する前での食肉等の病原菌の殺菌処理が必要であることを示しているように思われる。

食肉等の衛生化に必要な殺菌線量は2～3kGyで十分と思われるが<sup>6),9)</sup>、本研究の結果では薬剤耐性病原菌も同じような線量で殺菌できることが明らかである。薬剤耐性菌は非耐性菌より殺菌線量が若干少ない傾向があるが、実際の食品では誤差程度の差であり非耐性菌も食品中に混ざっている。薬剤耐性菌の方が非耐性菌に比べ放射線感受性が高いのはプラスミド含量が多いためと思われ、*E. coli* O157:H7株の放射線感受性が一般の *E. coli* に比べ著しく高かったのは核外遺伝子<sup>10)</sup>が関係しているのであろう。高線量における抗生物質含有培地での生存率が非含有培地に比べ高かったのは突然変異によるものではなく、細胞分裂速度が抗生物質の存在によって遅延され、放射線損傷の修復が起こりやすくなったためであろう<sup>7)</sup>。事実、先にも報告したように *E. coli* の放射線や紫外線による突然変異誘発能は最大でも約0.5%であり、高い頻度での薬剤耐性変異の誘発は考えられない<sup>11)</sup>。また、高線量照射した抗生物質含有培地からの分離株が著しい薬剤耐性を示さなかったことも薬剤耐性変異が起こりにくいことを示している。

#### まとめ

本研究で用いた菌株から誘導された薬剤耐性菌株は親株に比べ放射線感受性が高くなった。また、牛肉等から分離された *E. coli* 分離株では薬剤耐性株と

非耐性株の間に放射線感受性に大きな差は認められなかった。一方、放射線照射による薬剤耐性変異株の誘発は認められず、抗生物質含有培地での高線量域で生存率が高くなったのは細胞分裂能遅延効果によって放射線損傷が回復しやすくなったためであろう。

#### 文 献

- 1) Organic Consumers Association : Tainted, drug-resistant meat common Studies stir debate on antibiotic use in livestock.  
<http://www.organicconsumers.org>.
- 2) C. L. Hoface, et al.: Characterization of antibiotic-resistant bacteria in rendered animal products, *Avian Dis.*, **45(4)**, 953-956 (2001)
- 3) J. N. Sofos et al.: Sources and extent of microbiological contamination of beef carcasses in seven United States slaughtering plants, *J. Food Prot.*, **62(2)**, 140-145 (1999)
- 4) IASR : サルモネラの薬剤耐性  
<http://idsc.nih.gov.jp>.
- 5) 伊藤 均他：繰り返し照射による *Salmonella typhimutium* の放射線抵抗性の誘導, *食品照射*, **24**, 12-15 (1989)
- 6) 伊藤 均, Harsojo : 食肉中での大腸菌 O157:H7 の放射線殺菌効果, *食品照射*, **33**, 29-32 (1998)
- 7) 伊藤 均他：放射性抵抗性細菌 *Pseudomonas radiora* の放射線感受性と放射線損傷からの回復, *日本農芸化学会誌*, **46(3)**, 127-135 (1972)
- 8) 伊藤 均：未発表データ
- 9) Y. Prachasitthisak, D. Banachi and H. Ito : Shelf life extension of chicken meat by  $\gamma$ -irradiation and microflora changes, *Food Sci. Technol, Int.*, **2(4)**, 242-245 (1996)
- 10) 竹田多恵：エマージング腸管病原菌；新型コレラ菌・大腸菌はなぜ出現するのか, *科学*, Feb., 112-118 (1997)
- 11) 瀧上真智子, 伊藤 均：*Escherichia coli* のガンマ線および紫外線感受性と突然変異誘発について, *食品照射*, **30**, 11-16 (1995)