

琉球大学学術リポジトリ

産卵鶏糞便由来大腸菌の薬剤耐性

メタデータ	<p>言語:</p> <p>出版者: 琉球大学農学部</p> <p>公開日: 2008-02-14</p> <p>キーワード (Ja): 産卵鶏, 大腸菌, 薬剤耐性菌, Rプラスミド</p> <p>キーワード (En): Laying hen, Escherichia coli, Drug resistance, R plasmid</p> <p>作成者: 日越, 博信, 親里, 真理子, 宮平, 良成, 平川, 守彦, Higoshi, Hironobu, Oyasato, Mariko, Miyahira, Yoshinari, Hirakawa, Morihiko</p> <p>メールアドレス:</p> <p>所属:</p>
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3701

産卵鶏糞便由来大腸菌の薬剤耐性

日越博信・親里真理子・宮平良成・平川守彦

Hironobu HIGOSHI, Mariko OYASATO, Yoshinari MIYAHIRA and Morihiko HIRAKAWA : Drug resistance of *Escherichia coli* strains isolated from the feces of laying hens

キーワード : 産卵鶏、大腸菌、薬剤耐性菌、Rプラスミド

Keywords : Laying hen, *Escherichia coli*, Drug resistance, R plasmid

Summary

Fecal samples were collected from laying hens at various ages in a poultry farm in Okinawa Prefecture. A total of 826 strains of *Escherichia coli* were isolated from the samples and tested for sensitivity testing to 7 antibiotics. Transmissible R plasmid was investigated in the resistant strains.

Three hundred and fourteen strains (38.0%) were resistant to at least one of the 7 antibiotics tested. The prevalence of resistant strains was highest in the 20-day-old group (86.9%) and lowest in the 600-day-old group (8.8%), with a tendency of decrease with age. However, the prevalence was still 51.7% in the 500-day-old group, the second highest after the 20-day-old group. The rate of SA resistance was highest at 29.7%, followed by SM, CTC, KM and ABPC, in that order. SA resistance was the highest or second highest in all age groups, but CTC resistance was the highest in the 200- and 400-day-old groups, and ABPC and SA resistance was high in the 800-day-old group. The order of resistance rate among antibiotics varied slightly with age.

Twenty-three resistance patterns were detected ranging from single-agent to 6-agent resistance. Sixteen types were observed in the 20-day-old group and 7 types or less in the other age groups. Multiple resistance type, defined as resistance to 2 or more antibiotics, accounted for approximately 70%. In the 20-day-old group, particularly, 90% were of the multiple resistance type and 6-agent resistance was seen only in this age group.

* 琉球大学農学部生物生産学科

Transmissible R plasmid was investigated in 314 resistant strains. Sixty strains (19.1%) possessed R plasmid, 47 strains of which were from the 500-day-old group. No R plasmid possessing strain was detected in the 300-, 400- or 800-day-old group.

緒 言

抗生物質等の抗菌剤は、畜産分野において家畜・家禽の疾病の発生予防あるいは発育促進等の目的で、ごく普通に使用され、かなりの成果を上げている。しかし一方では、抗菌剤等の汎用が家畜・家禽における薬剤耐性菌の増加をもたらし、それらが家畜・家禽における疾病の治療の面で、また畜産物を介してヒトへの伝播の面で、家畜衛生上または公衆衛生上も問題視されている^{6,16,17}。

このような中であつて著者らは、沖縄県における家畜・家禽由来大腸菌の薬剤耐性の動向を調査中である^{1~5}。ニワトリは、一般的に幼・中雛期に薬剤添加の飼料が給与されているため、それらの糞便由来大腸菌では薬剤耐性が多いが、その後は薬剤無添加飼料が給与され生育に伴って減少すると言われている^{9,12,13,17}。しかし、産卵開始後から廃用になるまでの成鶏について、耐性菌の消長を調査した報告はほとんど見られない。

そこで今回は、沖縄県の産卵鶏における薬剤耐性菌の検出状況を知る目的で、本島内の一養鶏場で主に産卵中のニワトリから日齢別に糞便を採取し、これら糞便由来大腸菌について調査を行った。また、耐性菌については伝達性Rプラスミドの検索も行ったので、得られた成績の概要を報告する。

実験材料及び方法

1 実験材料及び採取方法

調査対象のニワトリは、本島南部の一養鶏場における幼雛期のヒナ及び産卵中の成鶏である。糞便試料は、1996年7月、日齢別(20日, 200日, 300日, 400日, 500日, 600日及び800日, 各日齢15羽, 800日齢5羽)に計95羽から採取した。試料の採取は、ケージの下に滅菌した糞受けを取り付け、落下直後の糞便を滅菌綿棒で行った。なお、800日齢は5羽のみ飼養され、これらは肛門に直接滅菌綿棒を挿入して採取した。

調査した養鶏場は、木造(3棟)及び鉄骨(1棟)鶏舎からなり、1段または2段のひな段配列様式のケージ飼いをを行い、糞便の除去状況及び換気・通風等は良好であった。給与飼料は市販の配合飼料を使用し、幼雛用には亜鉛バシトラシン、センデュラマイシンナトリウム及び硫酸コリスチンの3剤が、また中雛用には亜鉛バシトラシン、硫酸コリスチン及びサリノマイシンナトリウムの3剤が、それぞれ添加され、成鶏用は薬剤無添加であった。

2 大腸菌の分離と同定

大腸菌の分離にはマッコンキー寒天培地(栄研)平板を用い、これに上記の糞便試料を直接塗抹し、37℃24時間培養した。培養後、大腸菌と思われる集落を1試料当たり10個前後を釣菌した。

分離菌株の同定は、医学細菌同定の手びき¹⁵に準拠し型の通りに行い、合計826株(各日齢の菌株数については表1を参照)の大腸菌を得た。これら菌株について薬剤感受性試験を行うとともに、耐性菌については伝達性Rプラスミドの検索も行った。

3 薬剤感受性試験の方法

薬剤感受性試験は、日本化学療法学会標準法⁷⁾に準拠し、寒天平板希釈法で行った。使用した薬剤は、アンピシリン(ABPC)、クロラムフェニコール(CP)、クロルテトラサイクリン(CTC)、カナマイシン(KM)、ストレプトマイシン(SM)、ナリジキシ酸(NA)、スルファジメトキシシン(SA)の7種類である。各薬剤の耐性限界濃度は、SAが200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、他の6薬剤が25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。なお耐性菌における伝達性Rプラスミドの検索には、耐性菌を供与菌とし、NA耐性の大腸菌ML1410株を受容菌として、またNA耐性菌(3株)についてはリファンピシン(RFP)耐性の大腸菌C-600株を受容菌として、既報^{1,2)}及び大前¹⁴⁾の方法等に準拠して行った。

実験結果

産卵鶏の糞便由来大腸菌における薬剤耐性の検出状況を、日齢別に表1に示した。全体では、314株が供試した7薬剤のいずれかに耐性であり、その検出率は38.0%であった。日齢別の耐性菌検出率では、

Table 1. Drug resistance frequency in *Escherichia coli* isolated from feces of laying hens at various ages (days)

Age(days) of hens	No. of samples	No. of isolates	Drug resistance			
			Samples		Isolates	
			number	per cen	number	per cen
20	15	145	15	100.0	126	86.9
200	15	132	14	93.3	44	33.3
300	15	123	9	60.0	26	21.1
400	15	115	4	26.7	20	17.4
500	15	143	12	80.0	74	51.7
600	15	125	7	46.7	11	8.8
800	5	43	2	40.0	13	30.2
Total	95	826	63	66.3	314	38.0

Table 2. Frequency of drug resistance in *Escherichia coli* isolated from feces of laying hens

Drug*1	Age (days) of hens							Total (826)
	20 (145)*2	200 (132)	300 (123)	400 (115)	500 (143)	600 (125)	800 (45)	
ABPC	37.2	2.3	4.1	7.0	21.7	4.0	23.3	14.0
CP	9.0	0	0	0	0	0	0	1.6
CTC	44.8	27.3	4.1	14.8	5.6	2.4	7.0	16.6
KM	66.2	8.3	4.1	6.1	0	3.2	0	14.9
SM	75.9	14.4	8.1	7.0	32.9	3.2	0	24.0
NA	0.7	0	0	0	0	1.6	0	0.4
SA	77.2	25.0	13.8	10.4	37.8	5.6	23.3	29.7
Total of resistance	86.9	33.3	21.1	17.4	51.7	8.8	30.2	38.0

*1 Abbreviation : ABPC, ampicillin; CP, chloramphenicol; CTC, chlortetracyclin; KM, kanamycin; SM, streptomycin; NA, nalidixic acid; SA, sulfadimethoxine

*2 Number of strains tested

れていない。なぜ耐性菌が高率に検出されたのかは不明であるが、大腸菌症の発生が何らかの影響を及ぼしたものと思われる。

薬剤別の耐性菌検出率は、すでに言われているように^{10~12,17)}、全体ではSA、SM及びCTC耐性が上位3位までを占めた。しかし、20日齢ではKM耐性が、500日齢ではABPC耐性が、それぞれ3位の検出順位であったのに対し、800日齢ではABPC耐性がSA耐性と同率で1位を示すなど、薬剤別の耐性菌検出順位は日齢によって異なっていた。また、20日齢では供試した7薬剤すべてで耐性菌が検出され、しかもCP及びNA耐性を除いて高い検出率を示した。

耐性型は単剤型から6剤型まで23種類認められたが、20日齢では16種類もあったのに対し、産卵鶏では2~7種類であった。全体では70%が2剤以上の多剤耐性型であり、特に20日齢では多剤耐性型が90%に達し、6剤型も本日齢のみで検出された。また200日、500日及び800日齢でも59~77%が多剤耐性型であった。ニワトリ由来大腸菌では多剤耐性型が多いとされている^{9,11~13,17)}が、300日、400日及び600日齢では逆に過半数が単剤型であり、産卵鶏でも日齢による違いが見られた。

なお、今回20日齢及び200日齢以降の産卵鶏から検出された薬剤耐性菌は、幼・中雛期の給与飼料に添加された薬剤とは違うものであり、なぜこうなるのか不可解である。同様のことはすでに金城¹²⁾も指摘しているが、これらの原因として鶏舎、環境・ヒト等の関与が考えられる。調査した産卵鶏のうち、200日、600日及び500日齢は同一鶏舎内で、しかも200日齢と600日齢は背中合わせのケージで飼育されていた。しかし、すでに記述したようにこれら3群の耐性菌検出率、薬剤別の検出順位、耐性型などが異なっていた。同一環境で長期間飼育され、同一人が管理した成鶏でもこのような状況であり、相互の関与も不明確で何が影響しあったのか理解しがたい。

耐性菌314株における伝達性Rプラスミド保有菌の検出率は、全体では19.1%(60株)であった。成鶏におけるRプラスミド保有率では、特に500日齢が63.5%で最高、次いで600日齢27.3%、200日齢6.8%であり、他の日齢では検出されなかった。500日齢で耐性菌検出率が高かったのは、このRプラスミドも関与したのかもしれない。しかし、20日齢では耐性菌検出率が高く、多剤耐性菌も多かったにもかかわらず、Rプラスミド保有率は5.6%と低率であった。金城¹²⁾が本県で行った成績では、幼雛で21.6%、180日齢以上の成鶏で35.8%、また金井ら^{8~10)}は食鳥由来で28~48%が、それぞれRプラスミド保有菌であったと報告している。これらの成績を見ると、Rプラスミド保有菌の検出率は養鶏場、日齢、育成中の疾病発生あるいは調査地域等によって異なるように思われる。

以上のように今回は一養鶏場の調査ではあるが、産卵中のニワトリでも耐性菌検出率、薬剤別の耐性菌検出順位、耐性型、Rプラスミド保有率等は日齢によって異なることが示唆された。その理由を追求するにはかなりの困難が伴いそうであるが、他の養鶏場についても調査を行うと同時に、同一鶏群を日を追って検討する必要があると思われる。

摘 要

沖縄本島内の一養鶏場で産卵鶏の日齢別に採取した糞便由来大腸菌合計826株について、7薬剤に対する感受性試験を行い、また耐性菌については伝達性Rプラスミドの検索も試みた。

供試した7薬剤のいずれかに耐性の大腸菌は、314株(38.0%)であった。日齢別の耐性菌検出率は20日齢が86.9%で最高、600日齢が8.8%で最低であり、加齢に伴い低下する傾向を示した。しかし、500日齢では51.7%を示し、20日齢に次いで高い値であった。薬剤別ではSA耐性が29.7%で最高、以下SM、CTC、KM、ABPC耐性などの順であった。各日齢ともSA耐性が1位または2位の検出率を示したが、200日及び400日齢ではCTC耐性が1位を、また800日齢ではABPC耐性とSA耐性が同率で1位を示すなど、日齢によって検出順位が異なった。

耐性型の種類は、全体では単剤型から6剤型まで23種類認められたが、20日齢では16種類、他の日齢

では7種類以下であった。また2剤以上の薬剤に耐性の多剤耐性型が約70%を占め、特に20日齢では90%が多剤耐性型であり、6剤型も本日齢のみで検出された。なお200日、500日及び800日齢でも59～77%が多剤耐性型であった。

耐性菌314株における伝達性Rプラスミドの検索では、60株(19.1%)がRプラスミドを保有していたが、うち47株は500日齢由来であった。300日、400日及び800日齢ではRプラスミド保有菌が検出されなかった。これら菌株の伝達耐性型は単剤型から4剤型まで見られたが、49株が単剤伝達型であり、残りの2～4剤伝達型は20日及び500日齢由来であった。

試料採取にご協力頂いた養鶏場の関係者各位に感謝致します。

引用文献

1. 日越博信, 猪俣隆一 1985 子豚ふん便由来大腸菌の薬剤耐性とRプラスミド, 琉大農学報, 32 : 133～141
2. 日越博信, 上間章功 1991 食鳥ふん便由来大腸菌の薬剤耐性とRプラスミド, 琉大農学報, 38 : 17～22
3. 日越博信, 長田健司, 山城倫子, 平川守彦, 1994 ウシの盲腸内容物由来大腸菌の薬剤耐性, 琉大農学報, 41 : 155～160
4. 日越博信, 具志堅 宏, 平川守彦 1995 肉用牛糞便由来大腸菌の薬剤耐性, 琉大農学報, 42 : 33～38
5. 日越博信, 東江靖晴, 平川守彦 1996 乳用牛直腸便由来大腸菌の薬剤耐性, 琉大農学報, 43 : 7～12
6. Hinton, M.H. (戸塚耕二訳) 1991 家禽産業における抗生物質の使用と公衆衛生, 畜産の研究, 45 : 46～48
7. 河喜多龍祥 1987 薬剤感受性検査, 1版, P66～69, 東京, 近代出版
8. 金井 久, 五十嵐丈人 1980 育成中の1ブロイラー群(1日齢と28日齢)から分離された大腸菌の薬剤耐性とRプラスミド, 家禽会誌, 17 : 193～198
9. Kanai H., Hashimoto H. and Mitsunashi S. 1983 Drug resistance and conjugative R plasmids in fecal *Escherichia coli* strains isolated from healthy younger animals(chickens, piglets, calves) and children, Microbiol. Immunol., 27 : 1031～1041
10. 金井 久, 阿部伸司 1991 健康ブロイラー直腸便由来大腸菌の主要抗菌剤に対する感受性, 畜産の研究, 45 : 296～304
11. Kinjo T. 1974 Drug resistant strains of bacteria isolated from domestic animals in Okinawa II. Distribution of R factor in fecal *E. coli* strains isolated from pigs and chicken, Sci. Bull. Coll. Agr. Univ. Ryukyus, 21 : 389～402
12. 金城俊夫 1978 発育期を異にするニワトリの糞便由来大腸菌の薬剤耐性とR因子, 琉大農学報, 25 : 399～409
13. 金城俊夫 1979 沖縄県における各種動物および人糞便由来大腸菌の薬剤耐性とRプラスミド, 日畜会報, 50 : 542～548
14. 大前憲一 1982 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
15. 坂崎利一訳 1981 医学細菌同定の手びき, 2版, 東京, 近代出版

16. 寺門誠致 1990 薬剤耐性菌の功罪, 動薬研究, 43 : 27~40
17. 寺門誠致, 佐藤儀平, 斉田 清, 佐藤昭子, 金井 久 1985 三橋 進ら編, 薬剤耐性菌による環境汚染, 1版, P121~151, 東京, 学会出版センター