琉球大学学術リポジトリ

乳用牛直腸便由来大腸菌の薬剤耐性(生物生産学科)

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): 乳用牛, 大腸菌, 薬剤耐性菌, Rプラスミド キーワード (En): Dairy cattle, Escherichia coli, Drug resistance, R plasmid 作成者: 日越, 博信, 東江, 靖典, 平川, 守彦, Higoshi, Hironobu, Agarie, Yasunori, Hirakawa, Morihiko メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3723

乳用牛直腸便由来大腸菌の薬剤耐性

日越博信*・東江靖典*・平川守彦*

Hironobu HIGOSHI, Yasunori AGARIE and Morihiko HIRAKAWA : Drug resistance of *Escherichia coli* strains isolated from the rectal content of dairy cattle

キーワード：乳用牛、大腸菌、薬剤耐性菌、Rプラスミド
Keywords：Dairy cattle, *Escherichia coli*, Drug resistance, R plasmid

Summary

The sensitivity to seven antibiotics of 652 *Escherichia coli* strains isolated from the rectal contents of 78 healthy dairy cows (Holstein) from three dairy farms in Okinawa Prefecture was tested. Transmissible R plasmid was also examined in resistant strains.

Sixty-eight *E. coli* strains (10.4%) were resistant to at least 1 of the 7 tested antibiotics. The resistant strain detection rate was 5.5% in Farm C, 8.7% in Farm A and 16.5% in Farm B. CTC resistance was the most common at 9.5%, resistance to the other antibiotics was less than 5% and NA resistance was not detected. CTC-resistant strains were the most common in all three farms. The proportions of SM-and SA-resistant strains were slightly higher in Farm B. There were 10 resistance patterns ranging from 1−agent to 6−agent resistance. Over half (51.5%) of all the resistant strains were resistant to 2 or more agents, particularly, over 60% of those from Farm B were multi-drug resistant. The six-agent resistant strain was derived from Farm B. In contrast, over 60% of the resistant strains from Farms A and C were resistant to one agent. Transmissible R plasmid was examined in 68 antibiotic resistant *E. coli* strains. R plasmid was detected only in 5 strains from Farm A, and in all 5 strains the transmissible resistance type was 1−agent type to CTC.

緒　言

著者らは、沖縄県における家畜由来大腸菌の薬剤耐性の動向を調査中であるが、すでに各種家畜糞便及び畜産物由来大腸菌については報告済みである[1-5]。そのうち肉用畜としてと畜場に搬入された成牛

* 琉球大学農学部生物生産学科
琉球大学農学部学術報告　**43**：7～12（1996）

の盲腸内容物由来大腸菌についての調査[4]では、耐性菌の検出率は低かったが、ウシの品種等によって耐性菌の検出率、薬剤別の耐性の内容、耐性型などが大きく異なっていた。さらに昨年は、3農場で肥育中の肉用牛糞便由来大腸菌について、ウシの品種等（黒毛和種、外産牛、乳F_1）別に調査を行ったが[5]、やはり若干の違いがみられた。しかし、盲腸内容物由来において耐性菌の検出率が最高であった外産牛は糞便由来では最低を示し、黒毛和種では逆の成績を示すなど、異なった成績が得られ、品種等の違いの他に農場によって異なるように思われた。

そこで今回は、乳用牛における薬剤耐性菌の検出状況を知ると同時に、酪農家による違いをみる目的で、本県内の3酪農家において、それぞれ搾乳中の健康な乳用牛（ホルスタイン種）の直腸便を採取し、これらの直腸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、これらの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

調査対象の乳用牛は、本島内のA（北部、30頭）、B（中部、28頭）、C（南部、20頭）の3酪農家において搾乳中の一見健康な乳用牛（ホルスタイン種）、合計78頭である。試料は、1995年5～7月に、各乳用牛の直腸内に滅菌綿棒を約10cm挿入して採取した直腸便である。

調査した3酪農家の畜舎は、RC型または木造の違いはあるが、いずれも対頭型のつなぎ飼い方式であった。A及びC酪農家は畑地の中に単独で位置し、B酪農家は数戸からなる酪農団地内の1戸である。飼料は3酪農家とも購入乾草及び配合飼料を使用し、また畜舎内の外見上の衛生状態は、晴天時にみたこともあり普通の状態であった。

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、これに上記の直腸便試料を直接塗抹し、35℃20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7～12個を釣菌した。

分離菌株の同定は、医学細菌同定の手びき[12]に準拠し型の通りに行い、合計652株（A酪農家：229株、B酪農家：224株、C酪農家：199株）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ン（SA）の7種類である。各薬剤の耐性限界濃度は、SAが200μg／ml、他の6薬剤が25μg／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、既報[1]及び大前[11]の方法等に準拠して行った。

実験結果

乳用牛の直腸便由来大腸菌652株における薬剤別にみた耐性菌の検出状況を、酪農家別に表1に示した。全体では、68株が供試薬剤のいずれかに耐性であり、その検出率は10.4％と極めて低率であった。酪農家別の耐性菌の検出率では、B酪農家の16.5％が最高で、以下A酪農家の8.7％、C酪農家の5.5％であった。なお表示はしなかったが、頭数別の耐性菌検出率は全体では25.6％であり、A酪農家が30.0

Table 1. Frequecy of drug resistance in *E.coli* isolated from the rectal content of dairy cattle

Drug*1	Dairy farm A (229)*2	B (224)	C (199)	Total (652)
ABPC	1.3	1.3	0.0	0.9
CP	0.4	1.3	0.0	0.6
CTC	8.3	14.7	5.0	9.5
KM	0.0	1.3	0.0	0.5
SM	3.1	8.0	1.5	4.3
NA	0.0	0.0	0.0	0.0
SA	0.9	9.4	2.0	4.1
Total of resistance	8.7	16.5	5.5	10.4

*1 Abbrevation : ABPC, ampicillin ; CP, chloramphenicol ; CTC, chlortetracyclin; KM, kanamycin ; SM, streptomycine ; NA, nalidixic acid ; SA, sulfadimethoxine
*2 Number of strains tested

%で最高を示し、以下B酪農家25.0%、C酪農家20.0%であった。B酪農家で耐性菌の検出されたウシの多くは、分離された菌株の殆どが耐性を示したのに対し、A及びC酪農家ではそのようなウシが少なかった。

薬剤別の耐性菌の検出率は、いずれの薬剤に対しても低かったが、そのなかでもCTC耐性が9.5%で最も高く、以下SM耐性の4.3%、SA耐性の4.1%などの順であったが、NA耐性は検出されなかった。酪農家別にみた耐性菌の検出率では、B酪農家が他の2酪農家に比較していずれの薬剤に対しても高い値を示し、CTC、SM及びSA耐性の検出率がやや高かった。一方、C酪農家ではCTC、SM及びSAの3薬剤に対する耐性のみであり、しかもいずれも低率であった。A酪農家は前2者の中間的な検出率であり、NA耐性の他にKM耐性も検出されなかった。

乳用牛の直腸便由来薬剤耐性大腸菌における耐性型を表2に示した。耐性型の種類は、全体では単剤

Table 2. Drug resistance patterns of *E.coli* isolated from the rectal content of dairy cattle

Resistance patterns	Dairy farm A	B	C	Total	(%)
CTC	11	10	6	27	
SM		3	1	4	33
SA	1	1		2	(48.5)*
ABPC-CTC	1			1	
CTC-SM	5	3		8	19
CTC-SA		8	2	10	(28.0)
ABPC-CTC-SM	1			1	12
CTC-SM-SA		9	2	11	(17.6)
ABPC-CP-CTC-SM-SA	1			1	(1.5)
ABPC-CP-CTC-KM-SM-SA		3		3	(4.4)
Total	20	37	11	68	(100)

* Number in parenthesis indicates percentage

型から6剤型まで10種類認められたが、4剤型はみられなかった。耐性型は、全体では半数（48.5%）近くを単剤型が占め、次いで2剤型、3剤型の順に多かった。しかし、B酪農家では62.2%（23／37株）が2剤以上の薬剤に耐性の多剤耐性型であり、しかも6剤型も検出されたのに対し、A（12／20株）及びC酪農家（7／11株）では60%以上が逆に単剤型であった。また、耐性型の種類もB酪農家が7種類、A酪農家が6種類、C酪農家が4種類であり、酪農家によって若干の違いがみられた。

薬剤耐性大腸菌68株について、伝達性Rプラスミドの検索を行った。成績については表3に示したが、

Table 3. Transmitted resistance patterns of R plasmid in resistant *E.coli* strains

Resistance patterns of original strain	Resistance patterns of R plasmid	Dairy farm			Total
		A 20*	B 37	C 11	68
CTC	CTC	5	0	0	5 (7.4%)

＊：Number of strains tested

5株（7.4%）のみがRプラスミド保有菌であり、5株ともA酪農家由来であった。この5株の伝達耐性型はすべてCTC単剤型であり、また原菌株における薬剤耐性型もCTC単剤型であった。なお、耐性菌検出率が比較的高く、また多剤耐性型も多かったB酪農家では、Rプラスミド保有菌は検出されなかった。

考　察

今回の乳用牛（ホルスタイン種）直腸便由来における薬剤耐性大腸菌の検出率は10.4%であり、既に報告したと畜場で採取した肉用牛盲腸内容物由来（13.1%）[4]および農場で肥育中の肉用牛糞便由来（22.3%）[5]に比較してやや低かった。しかし、盲腸内容物由来大腸菌のうちホルスタイン種における耐性菌の検出率は6.7%であり、同時に調査した黒毛和種由来とはほぼ同じであったが、外産牛由来に比較すると低率であった。一方、寺門ら[14]は北海道のと畜場で採取した乳用牛の糞便由来大腸菌について調査を行っているが、8.8%が耐性菌であったと報告しており、著者らの乳用牛直腸便由来における成績より若干低い。また今回の成績は、本県での金城[8]による肉用牛の糞便由来大腸菌における成績（23.0%）に比較しても低かった。なお、ウシの頭数別にみた耐性菌検出率においては、今回の乳用牛が25.6%であったのに対し、農場における肉用牛では67.2%と高い値を示した[5]。

これらの成績をみると乳用牛（ホルスタイン種）由来の大腸菌は、肉用牛（黒毛和種）由来のそれに比較して、薬剤耐性菌の検出率が低いような印象を受ける。これらは、乳用牛と肉用牛とでは飼養管理方法、搾乳中の乳用牛には薬剤の投与ができないなど、の違いがあるためと考えられる。しかし、既報[5]でも記述したように、ウシにおける薬剤耐性菌の検出率は品種等の違いだけでなく、飼養農場によっても大きく異なるものと考えられた。これと同様のことが、今回の乳用牛の調査でも窺われた。即ち、今回は3地区の各1酪農家について調査を行ったが、耐性菌の検出率はC酪農家の5.5%からB酪農家の16.5%の範囲にあり、酪農家によって異なっていた。3酪農家の飼養形態、給与飼料などに大きな違いは見られなかったが、B酪農家が酪農団地内の1戸であり、このことを考慮する必要があるかもしれない。

薬剤別の耐性菌検出率はいずれも低率であったが、全体ではCTC、SM、SA耐性の順に検出され、既報の肉用牛由来とはSM耐性とSA耐性の順が逆ではあるが、これら3薬剤に対する耐性菌が上位を占め

ているのは同じであった。またブタ[3]及びニワトリ[2]由来でもほぼ同じであり、これらの薬剤がいまなお畜産分野で常用[15]されていることが窺われる。なお、肉用牛由来ではNA耐性が検出されたのに対し、今回の乳用牛由来ではNA耐性が検出されなかった。乳用牛由来ではNA耐性以外にA酪農家ではKM耐性が、C酪農家ではKM、ABPCおよびCP耐性が、それぞれ検出されず酪農家による違いがみられた。

耐性型の種類でも、B酪農家が6剤型を含む7種類、A酪農家が5剤型を含む6種類、C酪農家が全て3剤型以下の4種類であった。また、B酪農家では2剤以上の薬剤に耐性の多剤耐性型が60％以上を占めているのに対し、A及びC酪農家では逆に単剤耐性型が60％以上を占めた。今回の調査では1頭当たり7～12株の大腸菌を分離し感受性試験を行ったが、B酪農家のウシでは耐性菌の検出された7頭中4頭で殆どの菌株が耐性を示し、A（2／9頭）及びC酪農家（1／4頭）ではそのようなウシは少数であり、これがB酪農家の耐性菌検出率を高くしていた。なお、このようなウシについて、過去における乳房炎の発症または治療歴などの聞き取り調査を行ったが、不明であり高率に耐性菌を排出している理由を明らかにできなかった。

耐性菌における伝達性Rプラスミド保有菌の検出を試みたが、5株（7.4％）が保有しているのみであり、金城[8]が本県の肉用牛由来で調査した成績（12.9％）、また他府県での子牛[6]または成牛[9,10,14]由来で調査した成績（39.3～60％）に比較してかなり低かった。これらの伝達性Rプラスミド保有菌は、全てA酪農家の1頭のウシから分離されたもので、5株ともCTC単剤伝達性であり、また原菌株の薬剤耐性型もCTC単剤型であった。B酪農家においては他の2酪農家に比較して多剤耐性型が多く検出されたが、伝達性Rプラスミドは検出されなかった。

今回の調査から、酪農家による違いだけでなく、ウシ個体によっても耐性菌検出率、耐性型、伝達性Rプラスミド保有率などが異なることが明らかになった。そこで、特に多数の耐性菌が検出されたウシの治療歴などについて聞き取り調査を行ったが、関連性を明らかにできなかった。これらは、酪農家または管理者の意識、管理方法、周囲の環境などにも影響されると考えられたが、そこまで調査するのは困難なように思われた。

摘　要

沖縄県内の3酪農家で搾乳中の健康な乳用牛（ホルスタイン種）、合計78頭の直腸便から分離した大腸菌652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1薬剤に耐性の大腸菌は、全体では68株（10.4％）であった。酪農家別の耐性菌検出率では、C酪農家5.5％、A酪農家8.7％、B酪農家16.5％であった。薬剤別では、CTC耐性菌が9.5％で最も高く、他の薬剤に対する耐性菌は5％未満であったが、NA耐性菌は検出されなかった。3酪農家由来ともCTC耐性菌が最高であったが、B酪農家由来ではSMおよびSA耐性菌も若干高い値を示した。

耐性型の種類は単剤型から6剤型まで10種類認められたが、4剤型は検出されなかった。また全体では、2剤以上の薬剤に耐性の多剤耐性型が過半数を占め、特にB酪農家由来では60％以上が多剤耐性型であり、6剤耐性型も本酪農家由来であった。一方、A及びC酪農家由来では60％以上が逆に単剤耐性型であった。

耐性菌68株について、伝達性Rプラスミドの検索を行った結果、A酪農家由来の5株のみがRプラスミドを保有していた。この5株の伝達耐性型は、すべてCTC単剤型であった。

試料採取に当たっては沖縄県中央家畜保健衛生所、同北部家畜保健衛生所および酪農家の方々のご協力を頂いた。各位に深謝致します。

引用文献

1. 日越博信、藤沢倫彦、高田潤一 1984 乳牛の分房乳から分離した大腸菌の薬剤耐性とRプラスミド、琉大農学報、**31**：111～117
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、野口蘭子、香西 献 1992 肥育豚ふん便における薬剤耐性大腸菌の経時的消長、琉大農学報、**39**：13～19
4. 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
5. 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
6. 細田紀子、伊藤博哉、鮫島俊哉、浜岡隆文、寺門誠致、1990 牛および豚の病性鑑定材料由来大腸菌の薬剤耐性とRプラスミド、日獣会誌、**43**：25～28
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. 金城俊夫 1979 沖縄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、日畜会誌、**50**：542～548
9. 中村政幸、大前憲一、小枝鉄雄 1978 1976年に分離した牛、豚由来大腸菌の薬剤耐性およびRプラスミドの分布、動薬検年報、**15**：21～27
10. 中村政幸、大前憲一、吉村治郎、小枝鉄雄 1979 1977年に分離した牛、豚由来大腸菌の薬剤耐性およびRプラスミドの分布、動薬検年報、**16**：31～37
11. 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
12. 坂崎利一 訳 1981 医学細菌同定の手びき、2版、東京、近代出版
13. 寺門誠致 1990 薬剤耐性菌の功罪、動薬研究、**43**：27～40
14. 寺門誠致、畦地速見、前田博之、森永修正 1971 家畜および健康人由来大腸菌の*in vitro*における化学療法剤感受性とR因子について、日獣会誌、**25**：295～301
15. 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