琉球大学学術リポジトリ

肉用牛糞便由来大腸菌の薬剤耐性(生物生産学科)

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): 肉用牛, 大腸菌, 薬剤耐性菌, Rプラスミド キーワード (En): Beef cattle, Escherichia coli, Drug resistance, R plasmid 作成者: 日越, 博信, 具志堅, 宏, 平川, 守彦, Higoshi, Hironobu, Gushiken, Hiroshi, Hirakawa, Morihiko メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3743

肉用牛糞便由来大腸菌の薬剤耐性

日越博信*・具志堅　宏*・平川守彦*

Hironobu HIGOSHI, Hiroshi GUSHIKEN and Morihiko HIRAKAWA : Drug resistance of *Escherichia coli* isolated from the feces of beef cattle

キーワード：肉用牛，大腸菌，薬剤耐性菌，R プラスミド
Key words : Beef cattle, *Escherichia coli*, Drug resistance, R plasmid

Summary

Escherichia coli was isolated from 64 head of the beef cattle fattened in 3 farms in Okinawa Prefecture [25 Japanese Blacks, 24 imported steers fattened in Okinawa (imported cattle) and 15 offsprings from Holstein and Japanese Black (F_1 hybrid)].

A total of 610 strains of *E. coli* (235 from Japanese Blacks, 228 from imported cattle and 147 from F_1 hybrid) were isolated and antibiotic sensitivity tests to ABPC, CP, CTC, KM, SM, NA and SA were performed.

Of the 610 isolates, 136 (22.3%) were resistant to one of the antibiotics tested. The antibiotic-resistant *E. coli* isolation rate was 30.6% in Japanese Blacks, 16.7% in imported cattle and 17.7% in F_1 hybrid. The overall antibiotic resistant rates were 12.8% and 10.2% for CTC and SA, respectively, and less than 5% for the other antibiotics. Fourteen antibiotic resistance patterns, ranging from single-agent to 4-agent resistance were detected : eleven patterns in imported cattle, 9 patterns in Japanese Blacks and 6 patterns in F_1 hybrid. While 62 to 71% of the strains isolated from imported cattle and F_1 hybrid were resistant to a single agent, over 50% of the strains from Japanese Blacks were resistant to 2 or more antibiotics.

Transmissible R plasmid were examined in the antibiotic resistant *E. coli* strains. Of the 126 strains examined, 16 (12.7%) possessed transmissible R plasmids. They were found in 20% of the resistant strains from imported cattle, 11.5% of those from F_1 hybrid and 10% of those from Japanese Blacks. The type of transmissible resistance was all one-agent type.

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知る目的で，これまで各種家畜糞便及

*琉球大学農学部生物生産学科
琉球大学農学部学術報告　42：33～38（1995）

び畜産物由来大腸菌について調査を行ってきた[2~6]。そのうち子豚[3]，肥育豚[5]，ブロイラー[4]等の糞便由来大腸菌についての調査では，他府県[11,12,16,19]における調査報告同様いずれも高率に耐性菌が検出された。一方，と畜場に搬入された成牛の主として盲腸内容物由来大腸菌についての調査[6]では，耐性菌の検出率は極めて低く，また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り，興味のある成績が得られた。しかし，これらの盲腸内容物試料は，と畜場に搬入されたウシから無作為に採取されたものであるため，それらの違いがウシの品種等によるものなのか，あるいは農場によるものかは明らかでなかった。

そこで今回は，本県内で肉用牛を専門に肥育している3農場において，それぞれ肥育中のウシから糞便を採取し，これらの糞便由来大腸菌について，薬剤耐性菌の検出状況を品種等別に調査を行った。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

調査対象牛は本県南部または北部地区の3農場で肥育中の肉用牛，すなわち黒毛和種（雄，体重400kg以上，以下和種と略）　25頭，外産牛（ショートホーンとアバディーンアンガスの交雑種，雄，体重600kg以上）24頭，　乳用牛と和種の交雑種（雄・雌，体重不明，以下乳F_1と略）15頭，計64頭である。糞便試料は，1994年7～8月に，これら各肉用牛の排便直後のものをそれぞれ滅菌綿棒を用いて採取した。

調査した3農場は牛舎構造の違いはあるが，いずれもほぼ同じような飼養形態で，1牛房当たり十数～20頭を飼養していた。飼料は3農場とも主に購入乾草及び自家または購入牛用配合飼料を使用していたが，乳F_1飼養農場では特製の発酵調整した飼料を使用しているとのことであった。なお牛房内の外見上の衛生状態は，和種飼養農場が他2者農場より比較的良好であった。

2　大腸菌の分離方法と同定

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，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10個程度を釣菌した。

分離菌株の同定は，医学細菌同定の手びき[14]に準拠し型の通りに行い，合計610株（和種235株，外産牛228株，乳F_1 147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共に，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[9]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[2]及び大前[13]の方法等に準拠して行った。

実験結果

肉用牛の糞便由来大腸菌610株における薬剤別にみた耐性菌の検出状況を，ウシの品種等別に表1に示した。全体では，136株が供試薬剤のいずれかに耐性であり，その検出率は22.3%であった。品種等別にみた耐性菌の検出率では，和種由来が30.6%，乳F_1由来が17.7%，外産牛由来が16.7%であり，

後2者由来ではほぼ同率であったが，これらに比較して和種由来では高い値を示した。なお表示はしなかったが，頭数別の耐性菌検出率でも和種が76.0%で最高を示し，外産牛（62.5%）と乳F_1（60.0%）がほぼ同じ値を示した。

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，そのなかではCTC耐性が12.8%及びSA耐性が10.2%で比較的高かった。以下SM耐性，ABPC耐性，NA耐性，KM耐性の順であったが，いずれも5%未満であり，CP耐性は検出されなかった。品種等別にみると，和種由来ではCTC，

Table 1. Frequency of drug resistance in *E. coli* isolated from the feces of beef cattle

Drug *1	Japanese Black (235) *2	Imported cattle (228)	F_1 hybrid (147)	Total (610)
ABPC	8.9	1.3	0.7	4.1
CP	0.0	0.0	0.0	0.0
CTC	20.9	4.4	13.0	12.8
KM	0.9	0.0	2.0	0.8
SM	5.1	3.5	4.1	4.3
NA	0.9	3.5	0.0	1.6
SA	12.7	10.5	5.4	10.2
Total of resistance	30.6	16.7	17.7	22.3

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

Table 2. Drug resistance patterns of *E. coli* isolated from the feces of beef cattle

Resistance Patterns	Japanese Black	Imported cattle	F_1 hybrid	Total (%)	
CTC	12	4	12	28	
SM	1	1	4	6	78
NA	2	7		9	(57.4)*
SA	20	15		35	
ABPC-CTC	18			18	
CTC-SM	6	1	1	8	
CTC-SA	8	3	5	16	49
KM-SA			3	3	(36.0)
SM-SA		3		3	
SA-NA		1		1	
ABPC-SM-CTC	3	1	1	5	6
ABPC-SM-SA		1		1	(4.4)
ABPC-CTC-SM-SA		1		1	3
CTC-KM-SM-SA	2			2	(2.2)
Total	72	38	26	136	(100)

* Number in parenthesis indicates percentage

SA, ABPC, SM 耐性の順に，乳 F_1 由来では CTC, SA, KM, SM 耐性の順に，また外産牛由来では SA, CTC, SM, NA 耐性の順に，それぞれ検出率が高かった。一方，和種由来では CP 耐性が，外産牛由来では CP 及び KM 耐性が，また乳 F_1 由来までは CP 及び NA 耐性が，それぞれ検出されず，品種等によって若干の違いがみられた。

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，全体では単剤型から4剤型まで14種類認められたが，外産牛由来では11種類，和種由来では9種類，乳 F_1 由来では6種類であった。しかし，耐性菌の過半数（57.4%）は単剤型であり，次いでは2剤型（36.0%）が多く，3剤及び4剤型はごく少数であった。品種等別にみると，外産牛と乳 F_1 由来では単剤型が71%～62%を占めたのに対し，和種由来では逆に2剤以上の薬剤に耐性の多剤耐性型が過半数（51.4%）を占めた。また和種由来の多剤耐性型は，すべて CTC 耐性を中心としたものであった。なお，ABPC 耐性及び KM 耐性の単剤型はみられず，これら両薬剤に対する耐性菌はすべて他薬剤耐性との組み合わせによる多剤耐性型であった。

薬剤耐性大腸菌のうち NA 耐性を除く126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，16株（12.7%）がRプラスミド保有菌であり，和種由来が7株（10.0%），外産牛由来が6株（20.0%），乳 F_1 由来が3株（11.5%）であった。耐性菌検出率が最も高かった和種由来では，Rプラスミド保有菌の検出率が最低であった。これらの伝達耐性型はすべて単剤型であり，和種由来では CTC 及び SA 耐性，外産牛由来では SA 耐性のみ，乳 F_1 由来では KM 耐性のみであった。なお，Rプラスミド保有菌の原菌株における薬剤耐性型は，単剤型から4剤型までみられたが，その多くは2剤以上の多剤耐性型であった。

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

Resistance patterns of original strain	Resistance patterns of R plasmid	Japanese Black 70*1	Imported cattle 30	F_1 hybrid 26	Total 126
CTC	CTC	1			1
CTC-SM	CTC	4			4
KM-SA	KM			3	3
SA	SA	1	3		4
CTC-SA	SA	1			1
SM-SA	SA		2		2
ABPC-CTC-SM-SA	SA		1		1
Total		7 (10.0)*2	6 (20.0)	3 (11.5)	16 (12.7)

*1 : Number of strains tested
*2 : Number in parenthesis indicates percentage.

考　察

畜産分野において抗生物質など抗菌剤は，家畜の生産性向上，家畜疾病の発生予防，治療などで大きな役割を果たしてきた。しかし一方では，これら抗菌剤の多用は家畜由来細菌，とくに大腸菌の薬剤耐性化を促し，薬剤耐性を感受性菌に伝達するRプラスミド保有菌をも増加させたと言われる[1,7,16,17,19]。家畜における薬剤耐性大腸菌がヒトに直接影響を及ぼすか否かは詳細な検討が必要であろうが，それら耐性菌のうちRプラスミド保有菌が病原細菌に薬剤耐性を伝達する可能性も考えられ，公衆衛生上も懸念されている[1,7,16,17,19]。

今回著者らは，本県内の肉用牛肥育農場で肥育中の和種，外産牛，乳F_1の糞便由来大腸菌について，ウシの品種等別に調査を行った。その結果はすでに記述したように，全体での耐性菌の検出率は22.3%であった。ウシ由来大腸菌における耐性菌検出率については，中村ら[11,12]の健康な乳雄子牛及び肉牛における調査（53.1～68.8%），また細田ら[8]の病性鑑定材料の肉用子牛における成績（69.7%）があるが，いずれも家畜保健衛生所から収集した菌株とはいえ極めて高率である。一方，と畜場または農場で採取された成牛の糞便由来と考えられる大腸菌では，北海道での寺門ら[18]による乳牛由来で8.8%が，群馬県での鈴木ら[15]による乳牛由来で34.0%が，本県での金城[10]による肉用牛由来で23.0%が，それぞれ耐性であったと報告され，上記の中村ら及び細田らの成績より低い。今回の肉用牛糞便由来大腸菌についての耐性菌検出率は，前報[6]のウシ盲腸内容物由来の成績（13.1%）に比較して高率であったが，金城[10]による肉用牛由来の成績とはほぼ同じであり，寺門ら[18]と鈴木ら[15]による乳用牛由来の成績の中間にあった。しかし品種等別の耐性菌検出率では，前報の盲腸内容物由来で最低であった和種由来が最高を示し，逆に最高であった外産牛由来が乳F_1由来とほぼ同じとはいえ最低を示した。なお，頭数別の耐性菌検出率でも外産牛と乳F_1がほぼ同じであり，和種ではこの両者より高い値を示した。

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，SA，SM耐性の順に検出され，ブタ[3,5]及びニワトリ[4]由来と同様畜産分野で常用される薬剤に対する耐性菌が上位を占めていた。しかし品種等別では若干の違いがみられ，上位4種のうち2位まではいずれもCTCまたはSA耐性であったが，3位には和種由来がABPC耐性，外産牛由来がSM耐性，乳F_1由来がKM耐性，4位にはそれぞれSM，NA，SM耐性であった。また耐性型の種類でも，外産牛由来11種類，和種由来9種類，乳F_1由来6種類であり，耐性菌検出率の最も低かった外産牛由来で種類が多かった。しかし，外産牛由来と乳F_1由来は単剤型が71～62%を占めたのに対し，和種由来は2剤以上の多剤耐性型が過半数（51.4%）占め，やや違いがみられた。和種では，前報の盲腸内容物由来がすべて単剤型であったのとも異なっていた。

耐性菌における伝達性Rプラスミド保有菌の検出率は12.7%であり，金城[10]が本県の肉用牛由来で検出（12.9%）したのとほぼ同じであった。しかし，前述の他府県における子牛[8,11,12]または乳牛[15,18]由来での検出率（39.3～60%）よりはかなり低かった。品種等では，耐性菌検出率が最低であった外産牛由来で最も高く（20%），逆に耐性菌検出率が最も高かった和種由来で最低（10%）であった。これらRプラスミド保有菌の伝達耐性型はすべて単剤型であった。以上のように前報[6]の盲腸内容物由来程ではないが，同じ成牛由来大腸菌でも品種等によって耐性菌の検出率，耐性の内容，耐性型，Rプラスミド保有菌の検出率などが若干異なっていた。今回調査した3農場では，飼養形態，周辺環境，給与飼料などに大きな違いが見られなかったが，牛房内の衛生状態では和種飼養農場が比較的良好であった。しかし耐性菌検出率は和種由来が最高を示し，外見上の衛生状態と耐性菌検出率との間には直接の関係がみられなかった。これらのことから上述の違いは，ウシの品種等だけでなく，農場そのもの，管理者の意識，管理方法，肥育中の治療歴，導入前の薬剤投与歴などに影響されると思われるが，これらの詳細が不明である。

摘　要

沖縄県内の3農場で肥育中の肉用牛，64頭（和種25頭，外産牛24頭，乳F_1 15頭）の糞便から分離した大腸菌，合計610株について薬剤感受性試験を行った。

供試した7薬剤のいずれかに耐性であった菌株は，136株（22.3%）であった。ウシの品種等別にみた耐性菌検出率は，和種30.6%，外産牛16.7%，乳F_1 17.7%であり，和種が高かった。薬剤別の耐性菌検出率は，全体ではCTC耐性12.8%，SA耐性10.2%などが高く，他の薬剤耐性はいずれも5%未満であった。耐性型の種類は単剤型から4剤型まで14種類認められたが，外産牛では11種類，和種では9

種類，乳F_1では6種類であった。しかし，外産牛と乳F_1では単剤型が71～62%を占めたのに対し，和種では2剤以上に耐性の多剤耐性型が過半数を占めた。

耐性菌における伝達性Rプラスミド保有菌の検出率は，12.7%であった。ウシの品種等別では，外産牛が20%，乳F_1が11.5%，和種が10%であった。またこれらの伝達耐性型はすべて単剤型であった。

試料採取に当たっては沖縄県北部家畜保健衛生所，同中央家畜保健衛生所，各農場の方々の協力を頂いた。各位に感謝致します。

引用文献

1．吐山豊秋 1986 薬剤耐性菌による畜産食品汚染（1） 米国におけるPC・TC系飼料添加剤問題をめぐって，日獣会誌，39：285～289
2．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
3．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
4．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
5．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
6．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
7．Hinton, M. H. 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
8．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
9．河喜多龍祥 1987 薬剤感受性検査，1版，p66～69，東京，近代出版
10．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
11．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
12．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
13．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
14．坂崎利一訳 1981 医学細菌同定の手びき，2版，東京，近代出版
15．鈴木 要，磯貝誠吾，橋本 一 1970 反芻獣より分離した薬剤耐性大腸菌と，そのR因子について，日細菌誌，25：145～148
16．高橋 勇 1977 家畜における薬剤耐性菌の発現機構と現状，獣医界，112：16～35
17．寺門誠致 1990 薬剤耐性菌の功罪，動薬研究，43：27～40
18．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
19．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