

琉球大学学術リポジトリ

乳牛の分房乳から分離された大腸菌の薬剤耐性と R プラスミド(畜産学科)

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): キーワード (En): 作成者: 日越, 博信, 藤沢, 倫彦, 高田, 潤一, Higoshi, Hironobu, Fujisawa, Tomohiko, Takada, Junichi メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3972

乳牛の分房乳から分離された大腸菌 の薬剤耐性とRプラスミド

日越博信*・藤沢倫彦*・高田潤一*

Hironobu HIGOSHI, Tomohiko FUJISAWA and Junichi TAKADA: Drug resistance and R plasmids in *Escherichia coli* isolated from milk obtained from each quarter of the udder of milk cows

Summary

E. coli were isolated from milk produced by dairy cows in the southern district (780 samples from 201 cows) and northern district (575 samples from 148 cows) of Okinawa. 31 strains from the southern district and 61 strains from the northern district, a total of 92 strains were studied. Along with drug sensitivity tests using AM, CP, CTC, KM, SM, and SA, R plasmid was investigated in drug-resistant strains.

The frequency of detection of *E. coli* in the quarter milk was 2.1% in the southern district (16 samples) and 3.8% in the northern district (22 samples), both unexpectedly low.

When the limiting value of resistance against each drug was set at 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for SA and 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 5 other drugs, all test bacteria were resistant to one or more drugs. Resistance to SA was most frequently seen in both districts, followed by resistance to AM and SM in the southern district, and resistance to SM and CTC in the northern district. According to the resistance pattern, resistance to SA alone occupied 86.9% in the northern district, with less frequent multiple resistant strains. In the southern district, resistance to SA alone was seen most frequently in 38.7%, followed by resistance to 5 drugs, 32.3% and resistance to 4 drugs in 16.1%. Compared to the northern district, multiple resistant strains were more frequently detected.

Prevalence of R plasmid in the resistant bacteria was 41.9% in the southern district and 14.8% in the northern district. The transmitted resistance pattern of R plasmid was most frequently for SA alone in both districts, but transmitted resistance to 2 or 3 drugs was also detected. R plasmid of transmitted resistance to 2~3 drugs contained

* 琉球大学農学部畜産学科

transmitted resistance to SA in addition.

緒 言

抗生物質等の抗菌剤は、本来人体用医薬品として開発されたものであるが、近年では獣医・畜産、水産などの各領域でも使用されてきた¹³⁾。特に、獣医・畜産分野では家畜の疾病治療および予防のためばかりでなく、成長促進剤としても抗菌剤が使用されてきた。これらに伴って家畜における薬剤耐性菌の増加をもたらし、これが疾病の治療を困難にすると同時に畜産物を介してヒトへの移行も懸念されることから、公衆衛生上も重要な問題として取り上げられるようになった^{1,17)}。そのために、わが国では「飼料の安全性の確保および品質の改善に関する法律」(以下、飼料安全法)の施行、薬事法の一部改正などがあり、抗菌剤の使用が厳しく規制されるに至った¹⁴⁾。

家畜における薬剤耐性菌の問題に関しては各地で多くの調査・研究がなされ、特に畜舎汚水を含む各種家畜のふん便由来大腸菌における耐性菌の検出、それらのRプラスミドを保有する菌(以下、R⁺菌)の検索については報告が多い^{5-9,11,12,16,17)}。また沖縄県においても、Kinjoらが⁶⁻⁹⁾各種家畜のふん便由来大腸菌について同様の調査を行い、飼料安全法施行前の薬剤耐性菌およびR⁺菌の出現状況を明らかにしている。しかし、代表的な畜産物である生乳から分離した大腸菌について、そのような調査を行った報告はほとんどなく、乳房炎乳汁由来大腸菌の薬剤感受性を調べた報告が2, 3あるにすぎない^{3,10)}。

著者らは、本県の乳牛における潜在性乳房炎を調査中に、同乳房炎乳汁を含む分房乳から大腸菌の検出を試み、若干の菌株を分離した。今回は、これらの分房乳由来大腸菌について、薬剤感受性試験を行うとともに耐性菌についてはRプラスミドの検索を行い、これらの成績を試料採取地の南部地区と北部地区とに分けて比較したので、その概要を報告する。

実験材料および方法

1 供試材料

沖縄本島を南部地区と北部地区に分け、南部地区(4町村, 6戸)については1980年の夏季および秋季に延べ201頭の搾乳牛から分房ごとに採取した780試料であり、北部地区(2町村, 15戸)については1981年の6~12月に148頭から同様にして採取した575試料である。

2 供試大腸菌

試料0.1 mlをマッコンキー寒天培地「栄研」平板に塗抹し、培養後大腸菌と思われる集落について1試料当たり5個以上、これ以下の場合には全部を釣菌し、生化学的性状¹⁵⁾によって大腸菌を同定した。その結果、南部地区では16試料(大腸菌検出率2.1%)から31株を、北部地区では22試料(同3.8%)から61株を、それぞれ得てこれらを薬剤感受性試験に供した。なお、これらの菌株のうち南部地区では12株(3試料)が、北部地区では15株(6試料)が、それぞれ潜在性乳房炎乳汁由来であった。

3 薬剤感受性試験とR⁺菌の検索

感受性試験に使用した薬剤はアンピシリン(AM)、クロラムフェニコール(CP)、塩酸クロルテトラサイクリン(CTC)、硫酸カナマイシン(KM)、硫酸ストレプトマイシン(SM)、スルファジメトキシシン(SA)の6種類であり、またナリジキシン酸(NA)をR⁺菌検索の際に使用した。

薬剤感受性試験は、家畜の耐性菌研究会の標準法⁴⁾に従い、寒天平板希釈法で行った。耐性菌はSAでは200 μg/mlを、その他の5薬剤では25 μg/mlを、それぞれ含んだ平板培地上で発育のみられたも

日越ほか：分房乳由来大腸菌の薬剤耐性とRプラスミド

のとし、これらの菌株をR⁺菌の検索に供した。

R⁺菌の検索は、受容菌としてNA耐性の大腸菌ML 1410株を用い、Kinjo⁷⁾の方法に従って行った。すなわち、被検供与菌と受容菌を37°C 18時間混合培養し、その1白金耳量をNA 50 µg/mlとSAでは200 µg/ml、SA以外の5薬剤では25 µg/mlをそれぞれ含む平板培地上に培養し、発育したものをR⁺菌による耐性菌とした。なお、培地はSAについてはミューラーヒントン培地「栄研」を、SA以外の薬剤についてはハートインフュージョン寒天培地「栄研」を、それぞれ使用した。

実 験 結 果

1 薬剤耐性菌の出現状況とその耐性型

分房乳由来大腸菌、南部地区31株と北部地区61株の地区別にみた薬剤別の耐性菌の出現状況を、表1に示した。

Table 1. Frequency of drug resistance in *E. coli* isolated from milk obtained from each quarter of the udder

Drug *	Northern district (61 strains)		Southern district (31 strains)	
	No. of strains resistant	percent	No. of strains resistant	percent
AM	1	1.6	17	54.8
CP	0	0.0	10	32.3
CTC	6	9.8	7	22.6
KM	2	3.3	10	32.3
SM	7	11.5	16	51.6
SA	60	98.4	31	100.0
Total of resistance	61	100.0	31	100.0

* Abbreviation: AM, ampicillin; CP, chloramphenicol; CTC, chlortetracycline; KM, kanamycin sulfate; SM, streptomycin sulfate; SA, sulfadimethoxine

南部および北部地区ともに全株が、使用した6薬剤のうちいずれか1剤に耐性であった。これを薬剤別にみると、SAに対しては南部および北部地区ともにほとんど全株が耐性であり、両地区ともほぼ同じく高い出現率であった。しかし、SA以外の5薬剤に対する耐性菌の出現率は、いずれも南部地区の方が高く、特に南部地区ではAMおよびSMに対して過半数の菌株が耐性を示した。北部地区ではSA耐性菌に次いでSM耐性菌(11.5%)が多かったが、CP耐性菌はみられなかった。

次に、これら薬剤耐性菌の耐性型については、表2に示した。

南部地区では6種類、北部地区では7種類の耐性型がみられたが、両地区とも単剤耐性型が最も多かった。しかもその単剤耐性型は両地区ともSAのみの耐性型であり、特に北部地区ではほとんどがこのSA単剤耐性型であった。2剤以上に耐性を示した多剤耐性菌の出現率は、南部地区の方が明らかに高く、北部地区に比較して多剤耐性化の傾向が顕著であった。すなわち南部地区では、SA単剤耐性型に次いで5剤(AM-CP-KM-SM-SA)耐性型、4剤(AM-CTC-SM-SA)耐性型の順に多かった。なお、多剤耐性菌のうちCTC-SA 2剤耐性型を除くすべてが、SAをその耐性型の1部とし

Table 2. Drug resistance patterns of E. coli isolated from milk obtained from each quarter of the udder

Resistance pattern	Northern district (61 strains)		Southern district (31 strains)	
	No. of strains	percent	No. of strains	percent
5 AM-CP-KM-SM-SA	0	0.0	10	32.3
AM-CTC-KM-SM-SA	1	1.6	0	0.0
4 AM-CTC-SM-SA	0	0.0	5	16.1
CTC-KM-SM-SA	1	1.6	0	0.0
3 CTC-SM-SA	2	3.3	1	3.2
2 AM-SA	0	0.0	2	6.5
CTC-SA	1	1.6	1	3.2
CTC-SM	1	1.6	0	0.0
SM-SA	2	3.3	0	0.0
1 SA	53	86.9	12	38.7

ていたが、両地区とも同じ耐性型を示した菌株は意外に少なかった。

2 R⁺ 菌の検出状況とその耐性型

分房乳由来薬剤耐性大腸菌におけるR⁺ 菌の検出状況を、表3に示した。

Table 3. Resistance patterns and R plasmid in resistant strains of E. coli isolated from milk obtained from each quarter of the udder

Resistance pattern	Northern district			Southern district		
	No. of strains resistant	No. of R ⁺ strains	percent *	No. of strains resistant	No. of R ⁺ strains	percent *
AM-CP-KM-SM-SA	0	—		10	9	90.0
AM-CTC-KM-SM-SA	1	1	100.0	0	—	
AM-CTC-SM-SA	0	—		5	0	0.0
CTC-KM-SM-SA	1	0	0.0	0	—	
CTC-SM-SA	2	1	50.0	1	0	0.0
AM-SA	0	—		2	1	50.0
CTC-SA	1	0	0.0	1	1	100.0
CTC-SM	1	0	0.0	0	—	
SM-SA	2	1	50.0	0	—	
SA	53	6	11.3	12	2	16.7
Total	61	9	14.8	31	13	41.9

* No. of R⁺ strains per No. of resistant strains

日越ほか：分房乳由来大腸菌の薬剤耐性とRプラスミド

Table 4. Transmitted resistance pattern of R plasmid in resistant E. coli strains

Resistance patterns of original strain	Resistance pattern of R plasmids	Northern district		Southern district	
		No. of strains	percent	No. of strains	percent
AM-CTC-KM-SM-SA	AM-SM-SA	1	11.1	—	
AM-CP-KM-SM-SA	SM-SA	—		2	15.4
"	KM-SA	—		1	7.7
"	CP-SA	—		3	23.1
CTC-SM-SA	SA	1	88.9	—	53.8
SM-SA	"	1			
SA	"	6			
AM-CP-KM-SM-SA	"	—		3	
AM-SA	"	—		1	
CTC-SA	"	—		1	
Total		9	100.0	13	

R⁺菌の検出率は、南部地区では41.9%、北部地区では14.8%であり、南部地区の方が明らかに高率であった。南部および北部地区における5剤耐性型の菌株ではほとんどがR⁺菌であったが、4剤耐性型の菌株ではR⁺菌がみられなかった。また、単剤耐性型の菌株ではR⁺菌が少なかった。

次に、R⁺菌がどのような耐性型を受容菌に伝達したかを、表4に示した。

南部地区ではR⁺菌の13株中7株(53.8%)が、また北部地区では9株中8株(88.9%)が、SAのみを伝達した。ほかには、北部地区では3剤伝達耐性型が1株、南部地区では2剤伝達耐性型が6株みられた。また、検出されたすべてのR⁺菌は、SAをその伝達耐性型の1部にしていた。

考 察

潜在性乳房炎乳汁を含む分房乳からの大腸菌の検出率は極めて低く、またマッコンキー培地平板に出現した菌数も多くは0.1 ml当り10個未満であり、大腸菌は乳房内に侵入しづらいようであった。これらの分房乳から分離した少数株の大腸菌についてはあるが、薬剤感受性試験を行い、耐性菌およびR⁺菌の検出状況を地区別に比較した。

成績についてはすでに記述したが、両地区とも全株が使用した6薬剤のいずれか1剤に耐性であった。薬剤別では両地区ともSA耐性菌が最多であったが、南部地区は北部地区に比較していずれの薬剤にも耐性菌の出現率が高く、また多剤耐性菌の出現率も高かった。一般に、薬剤の使用頻度が高ければ耐性菌を生じ易く、それが増加するとされているが、^{1,17)} 今回の大腸菌が検出された乳牛において、過去に薬剤投与があったか否かは不明であった。しかし、給与飼料は両地区とも薬剤無添加のものであり、また同一乳牛群の潜在性乳房炎乳汁由来の主要細菌では薬剤耐性化がそれほど顕著でなかった²⁾ことから、両地区とも薬剤投与の頻度は高くなかったものと推察された。

乳房炎または正常なものを問わず、乳汁由来大腸菌の薬剤感受性試験についての報告は少ない。Sincowewら³⁾(第85回獣医学会)によると、乳房炎乳汁由来の腸内細菌科9菌種118株では、34.7%が耐性菌であり、いずれの菌種もSMおよびテトラサクリン(TC)に耐性の菌株が多く、さらに大腸菌ではKMとCP耐性菌が多かった。また、森永ら¹⁰⁾が試験した壊死性乳房炎由来大腸菌5株のディスク法による成績では、今回著者らの使用した薬剤を含めて多くのものに感受性であった。著者らの分房乳由来大腸菌では100%が耐性であり、しかも1株を除くすべてがSA耐性菌であった点で上記の成績と

異なっていた。

乳牛も対象にしたか否かは明らかでないが、ウシふん便由来大腸菌における薬剤耐性菌の出現率は8.8~68.8%であり、耐性型も多種多様である^{8,9,11,12,17)}。中村ら^{11,12)}は全国各地から集めたウシふん便由来大腸菌について、飼料安全法施行前後の薬剤耐性菌の動向を比較している。その成績によると、耐性菌の出現率が施行前の68.8%から施行後の53.1%に、また耐性型も27種類から15種類に、それぞれ減少し、さらに施行前TC耐性菌が最多であったのに施行後SM耐性菌が最多に変わっている。一方、本県のウシふん便由来大腸菌については、Kinjoら^{8,9)}が飼料安全法施行前に今回とほぼ同様の6薬剤に対する調査を行っている。その成績では、耐性菌の出現率は23.0%、耐性型は22種類に分かれ、なかでもTC単剤耐性菌が最多であり、次いでSA単剤耐性菌が多かった。これらのウシふん便由来大腸菌と分房乳由来大腸菌とでは、耐性菌の出現率、薬剤別の耐性菌、耐性型などが異なるようであった。

分房乳由来薬剤耐性大腸菌におけるR⁺菌の検出率は、地区によって異なつたが、全体では23.9%であった。この検出率は、Sincoweawら³⁾の乳房炎由来腸内細菌科における成績24.4%とほぼ一致していた。しかし、ウシふん便由来大腸菌における成績と比較すると、他府県での39.3~58.3%^{11,12,17)}よりは低いが、本県におけるKinjoら^{8,9)}の12.9%よりは高かった。先きに記述した中村ら^{11,12)}のウシふん便由来では、R⁺菌の検出率も飼料安全法施行前の57.7%から後の43.5%に低下している。しかし、今回の分房乳由来とKinjoら^{8,9)}のウシふん便由来とでは、単純に比較すべきでないかもしれないが、飼料安全法施行後数年を経過しているにもかかわらず、耐性菌ばかりかR⁺菌も増加していた。本県における薬剤耐性菌およびR⁺菌の検出状況については、Kinjoら^{6~8)}の調査以後なされていないので、その後の動向を調査する必要があるようである。また、分房乳から分離されたこれらの大腸菌がどこからきたかは不明であるが、同一乳牛または牛群のふん便由来大腸菌について同様の調査を行うとともに、搾乳器具などを含む環境との関係も追究する必要がある。

家畜における耐性菌がヒトに直接伝播するか否かは議論の分かれるところであり^{1,9,17)}、むしろ否定的な報告がある¹⁶⁾。今回検出された分房乳由来大腸菌の耐性菌およびR⁺菌が公衆衛生上問題であるか否かも直ちに判断できないが、現行の牛乳の殺菌法を考慮すると、これらの大腸菌が殺菌牛乳に生残する可能性は少ないかもしれない。しかし、分房乳からの出現率は低いかもしれないが、生乳中には薬剤耐性菌およびR⁺菌が存在すること、生乳の冷却が不備であればこれらが増数すること、また牛乳の殺菌法が顕著に向上したとはいえ100%完全でないこと、などは常に念頭に置くべきであり、そのためにも生乳の冷却、取扱いは十分留意する必要がある。

摘 要

沖縄本島南部地区(201頭, 780試料)および北部地区(148頭, 575試料)における乳牛の分房乳から分離した大腸菌、南部地区31株、北部地区61株、合計92株を対象にAM, CP, CTC, KM, SMおよびSAの6薬剤を用いて薬剤感受性試験を行うとともに、耐性菌についてはRプラスミドの検索を行った。

分房乳における大腸菌の検出率は、南部地区2.1%(16試料)、北部地区3.8%(22試料)であり、意外に低率であった。

各薬剤に対する耐性限界値をSAでは200 μ g/ml、他の5薬剤では25 μ g/mlとすると、全供試菌株がいずれか1剤に耐性であった。薬剤別には両地区ともSA耐性が多かったが、次いで南部地区がAM, SM耐性であり、北部地区がSM, CTC耐性であった。耐性型は、北部地区ではSA単剤耐性が86.9%を占め、多剤耐性菌が少なかった。南部地区における耐性型は、SA単剤耐性が38.7%で最も多く、次いで5剤耐性の32.3%、4剤耐性の16.1%であり、北部地区に比較して多剤耐性菌の出現率

日越ほか：分房乳由来大腸菌の薬剤耐性とRプラスミド

が高かった。

耐性菌におけるRプラスミドの保有率は、南部地区41.9%、北部地区14.8%であり、前者地区で高率であった。Rプラスミドの伝達耐性型は、両地区ともSA単剤伝達耐性型が多かったが、2剤および3剤伝達耐性型も検出された。また、2剤および3剤伝達耐性型のRプラスミドは、SAをその伝達耐性型の1部にしていた。

引用文献

1. 吐山豊秋 1982 動物用医薬品の安全性評価, 畜産の研究, 36 : 121 ~ 126
2. 日越博信, 八幡辰正 1984 ウシの潜在性乳房炎に関する研究, III, 潜在性乳房炎乳汁から分離された主要な細菌の薬剤感受性, 琉大農学法, 31 : 103 ~ 109
3. 飯塚三喜, 久米常夫, 原茂, 野附巖 1979 牛の乳房炎, 1版, 東京, 日本獣医師会
4. 家畜耐性菌研究会 1976 家畜由来の細菌に対する抗生物質等の薬剤の最小発育阻止濃度測定法について, 日獣会誌, 29 : 90 ~ 92
5. 金井久, 鈴木要, 清水健 1982 畜舎汚水から分離されたサルモネラと大腸菌の抗菌剤耐性と耐性プラスミド, 日獣会誌, 35 : 223 ~ 227
6. Kinjo, T., Ameku, C. and Enokawa, S. 1973 Drug Resistant strains of bacteria isolated from domestic animals in Okinawa I. Fecal *Escherichia coli* from pigs and chickens, Sci. Bull. Coll. Agr. Univ. Ryukyus, 20 : 327 ~ 334
7. ——— 1974 ——— II. Distribution of R factors in fecal *E. coli* strains isolated pigs and chickens, Sci. Bull. Coll. Agr. Univ. Ryukyus, 21 : 389 ~ 402
8. ———, Nakachi, H. and Akamine, Y. 1975 ——— III. Drug resistance and distribution of R factors among fecal *E. coli* strains isolated from cattle, goats and horses, Sci. Bull. Coll. Agr. Univ. Ryukyus, 22 : 331 ~ 342
9. 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, 日畜会報, 50 : 542 ~ 548
10. 森永修正, 工藤幸也, 松尾秀人, 工藤忠明 1970 大腸菌による牛の壊死性乳房炎について, 北獣会誌, 14 : 78 ~ 81
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. ———, ———, 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. 二宮幾代治編 1978 家畜の抗生物質と化学療法, 2版, 東京, 養賢堂
14. 小川信雄 1982 動物用医薬品の使用規制と適正使用, 畜産の研究, 36 : 93 ~ 95
15. 坂崎利一訳 1974 Cowan 医学細菌同定の手びき, 2版, 東京, 近代出版
16. 鈴木要, 五十嵐丈人 1976 野外における薬剤耐性大腸菌の汚染状況調査—とくに豚と養豚農家および非農家の人との関係, モダンメディア, 26 : 237 ~ 247
17. 高橋勇 1977 家畜における薬剤耐性菌の発現機構と現況, 獣医界, 112 : 16 ~ 36