

3. 若齢動物（ヒナ、子豚、子牛および幼齡児）から分離された大腸菌の薬剤耐性と接合性Rプラスミドの検出

金井 久（群馬県利根家畜保健衛生所）

大腸菌やサルモネラ等の薬剤耐性ならびに接合性Rプラスミドの保有状況については多くの成績が報告されている。^{1, 3, 4, 11, 12)}

しかしながら、それらの報告の大部分はそれぞれの動物について、別個の研究者によって調査された例が多く、またヒトにおいては病巣由来株が大部分を占めるなど断片的な成績も少ない。

このような状況下において、筆者らは養豚領域における広範な耐性菌浸潤調査を実施⁵⁾するとともに、過去の一連の調査において、人為的に薬剤の経口投与を受けているブロイラーでは耐性菌、Rプラスミド保有率ともに薬剤投与歴のない野鳥よりもはるかに高率であることを明らかにした。⁶⁾

今回、さらに抗菌剤の使用と耐性菌出現に関する成績を収集するため、若齢時期に大量かつ多種類の抗菌剤が人為的に経口投与されているヒナ、子豚、子牛に対し、薬剤投与頻度の低いと考えられる健康な幼齡児を対照とし、同一時期に大腸菌を分離し、薬剤耐性と接合性Rプラスミドについて比較検討したので報告する。

材料および方法

1. 検査対象動物：1979年に、臨床的に健康と思われる（a）ヒナ90羽、（b）子豚103頭、（c）子牛96頭および（d）幼齡児104人を対象とした。

2. 供試菌株：それぞれの個体から約30株ずつ分離された大腸菌、（a）2688株、（b）3089株、（c）2880株および（d）3120株を使用した。

3. 野外における抗菌剤使用状況：大部分の

農場において、飼料添加物として使用されている薬剤の他にテトラサイクリン、サルファ剤、アミノグリコサイド系薬剤が単味あるいは他剤と併用の形で頻用されており、中にはペニシリン系薬剤、オキソリン酸等が使用されている農場もあった。

4. 供試薬剤と選択濃度：下記の8薬剤を使用した。tetracycline (TC, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), chloramphenicol (CP, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), streptomycin (SM, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$), sulfonamides (SA, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), kanamycin (KM, 25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), aminobenzyl-penicillin (ABPC, AMと同じ 25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), nalidixic acid (NA, 25.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), colistin (CL, 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。

5. 大腸菌の同定法：常法²⁾に従った。

6. 耐性菌の決定と接合性Rプラスミドの検出法：前報⁷⁾に準拠した。

成 績

Table-1. に示したように、（a）においては90羽の全個体（100%）が耐性大腸菌を排出した。TC, SM, SA耐性株を保有した個体が、80羽以上と高率であったが、ABPCについてはわずか16羽であった。（b）においては103頭中102頭（99%）が耐性大腸菌を排出していた。TC, SM, SA耐性株を保有した個体が93頭以上と高率であったのに対し、CP耐性株保有個体は27頭にとどまった。（c）においては、96頭の全個体（100%）が耐性大腸菌を排出した。TC, SM, SA耐性株を保有した個体が82頭以上と高率であった。しかし、CP, KM, ABPC耐性株保有個体は、ほぼ同様な傾向で

Table-1 Number of animals excreting drug-resistant *E. coli* strains.^{e)}

Source	No. of animals surveyed	No. of animals excreting <i>E. coli</i> strains	No. of animals excreting <i>E. coli</i> strains resistant to						
			TC	CP	SM	SA	KM	ABPC	any drug
(a) Chickens	90	90	88	33	80	88	44	16	90
(b) Pigs	103	103	101	27	93	96	68	45	102
(c) Calves	96	96	94	45	93	82	55	55	96
(d) Pupils	104	104	56	16	37	54	20	20	67

e) About thirty *E. coli* strains were streaked randomly from each animals.

あった。(d)においては、耐性大腸菌を排出した個体は104人中わずか67人(64%)と著しく低率であった。TC, SAを排出した個体が54人以上と高い傾向を示したのに対して、CP, KM, ABPCは同様に低い傾向を示した。

Table-2. には各薬剤別に分離された耐性菌の頻度を示した。(a)では、2688株中、2633株(98.0%)が耐性菌として分離された。TC(83%), SA(86%)耐性株が最も高率に分離されたのに次いでSM(50%), KM

(23%)が高い傾向を示したが、CP(11%), ABPC(7%)は低率であった。この傾向は(b), (c)にもみられたが、(b)では3089株中2870株(93.0%)が(c)では2880株中2698株(94.0%)が耐性菌であった。(d)では、3120株中わずか1282株(41.0%)が耐性菌であった。TC(30.4%), SA(28.3%)耐性株が中でも高い傾向が認められたものの、SMは17.9%にとどまり、CP, KM, ABPCは8~10%と低率であった。なお、

Table-2 Isolation frequency of drug-resistant *E. coli* strains examined.

Drug	No. of resistant strains isolated. (%)			
	(a)	(b)	(c)	(d)
TC	2236 (83.2)	2686 (87.0)	2498 (86.7)	948 (30.4)
CP	294 (10.9)	194 (6.3)	681 (23.6)	251 (8.0)
SM	1350 (50.2)	2082 (67.4)	2296 (79.7)	557 (17.9)
SA	2306 (85.8)	2218 (71.8)	1822 (63.3)	884 (28.3)
KM	619 (23.0)	1162 (37.6)	1014 (35.2)	267 (8.6)
ABPC	185 (6.9)	490 (15.9)	857 (29.8)	300 (9.6)
NA	0	0	0	0
CL	0	0	0	0
Total Strains examined	2688	3089	2880	3120
Total resistant strains isolated	2633 (98.0)	2870 (93.0)	2698 (94.0)	1282 (41.0)

(a), (b), (c), (d) の4者ともNA および CL耐性株は分離されなかった。

Table-3.には、TC, CP, SM, SA の4剤を基幹としてみた場合の耐性菌分離頻度、および代表株(同一個体から分離され、同一耐性型を表現した株については1株を選出した)におけるRプラスミド検出率を示した。(a), (b), (c)を共通して3剤、2剤耐性型が主流をなした

が、(c)では4剤耐性型も決して少くなかった。(d)においては、1剤耐性型(15%)に3剤耐性型(10%)が次いだが、2剤、4剤耐性型は同様な頻度であった。Rプラスミドは、(a)48.4%、(b)33.3%、(c)37.8%と家畜では高率に検出されたのに対して、(d)ではわずか9.7%と著しく低率であった。

Table-3 Drug-resistant *E. coli* strains and their R plasmids in relation to TC, CP, SM and SA

No. of resistance markers in relation to 4 drugs.	No. of resistant strains and R plasmids.							
	(a)		(b)		(c)		(d)	
	No. (%)	R+ ^e	No. (%)	R+	No. (%)	R+	No. (%)	R+
4	158 (6)	13/21	167 (5)	17/30	621 (22)	40/62	184 (6)	1/10
3	1094 (41)	76/128	1403 (45)	63/158	1071 (37)	41/100	304 (10)	6/30
2	890 (33)	43/108	1015 (33)	39/141	652 (23)	34/104	256 (8)	1/26
1	492 (18)	23/63	273 (9)	10/57	296 (10)	0/37	480 (15)	1/38
Sensitive	54 (2)	-	231 (8)	2/7	240 (8)	0/1	1896 (61)	2/9
Total	2688(100)	155/320 (48.4)	3089(100)	131/393 (33.3)	2880(100)	115/304 (37.8)	3120(100)	11/113 (9.7)

e) From an individual animal one strain was selected for each resistance type.
Denominator, total number of resistant strains tested.
Numerator, No. of R⁺ strains.

分離されたRプラスミド耐性型をTable-4.に示した。(a)においては3剤、1剤耐性型が高率に分離されたのに次いで2剤耐性型が高い傾向を示したが6剤耐性型は分離されなかった。(b)においては1剤~4剤耐性型がほぼ類似した頻度で分離された。さらに6剤耐性型も若干分離された。(c)においては1剤、2剤耐性型が高

率であったのに次いで4剤、6剤耐性型も高い傾向を示した。(d)においては1剤耐性型が高率に分離された。3剤、5剤耐性型は2例ずつ同頻度に分離されたが、2剤、4剤、6剤耐性型は全く分離されなかった。いずれにしても(d)におけるRプラスミドの分離頻度は他の3者に比較して著しく低率であった。

Table-4 Resistance patterns of R plasmids isolated.

Resistance pattern of R plasmids	No. of R plasmids obtained.			
	(a)	(b)	(c)	(d)
TC·CP·SM·SA·KM·ABPC	. %	6 (3.7)	25 (18.9)	.
TC·CP·SM·SA·KM	2	.	2	.
CP·SM·SA·KM·ABPC	. 2	1 2	. 7	. 2
TC·SM·SA·KM·ABPC	. (1.0)	1 (1.2)	3 (5.3)	2 (16.7)
TC·CP·SM·SA·ABPC	.	.	2	.
TC·SM·SA·KM	7	6	11	.
TC·CP·SM·SA	6	2	.	.
TC·CP·SA·KM	1 14	. 44	2 23	.
SM·SA·KM·ABPC	. (7.5)	33 (26.8)	. (17.5)	.
TC·SM·SA·ABPC	.	3	.	.
TC·SM·KM·ABPC	.	.	10	.
TC·SM·SA	31	15	5	.
TC·CP·SA	18	.	.	2
TC·SM·KM	5	.	5	.
TC·SA·ABPC	2 60	. 38	. 16	. 2
TC·SA·KM	2 (32.3)	. (23.2)	1 (12.1)	. (16.7)
CP·SM·SA	1	1	.	.
SM·SA·KM	1	20	.	.
SM·SA·ABPC	.	2	.	.
TC·SM·ABPC	.	.	5	.
TC·CP	10	.	.	.
TC·KM	4	.	.	.
SM·SA	29	20	3	.
TC·SM	2	.	23	.
TC·ABPC	1 47	. 33	. 29	.
CP·SA	1 (25.3)	. (20.1)	. (22.0)	.
SA·ABPC	.	7	.	.
KM·ABPC	.	3	.	.
SA·KM	.	3	.	.
SM·KM	.	.	3	.
TC	57	18	24	3
SA	4	3	4	1
KM	1 63	12 41	. 32	4 8
CP	1 (33.9)	. (25.0)	. (24.2)	. (66.6)
ABPC	.	6	1	.
SM	.	2	3	.
Total	186 (100)	164 (100)	132 (100)	12 (100)
No. of R⁺ strains	155	131	115	11
No. of strains tested	320	393	304	113

考 察

それぞれの動物におけるRプラスミド、および耐性菌の分離頻度を Figure-1. に示した。

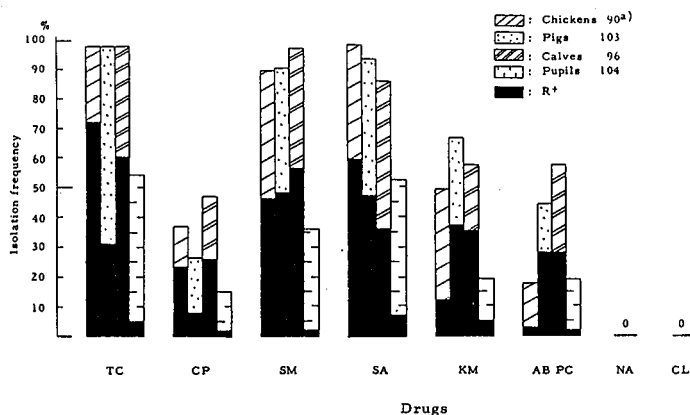
TC, SM, SA 耐性株を保有した家畜はいずれも高い傾向を示し、30%以上のRプラスミド保有率を示したが、幼齡児は耐性菌、Rプラスミド保有率ともに家畜に比較して著しく低率であった。KM, ABPC においては子豚、子牛が耐性菌、Rプラスミド保有率において、ヒナ、幼齡児を大中に上回っていた。CP においてはヒナ、子牛が子豚、幼齡児に比較して、耐性菌、Rプラスミド保有率ともに高い傾向を示した。

本稿の成績や前報⁸⁾の成績からも明らかのように、産業動物(若齡、熟齡ともに)では耐性菌および接合性Rプラスミドが高率に分離されたのに対して、健康な幼齡児や成人では著しく低率であった。この事実は使用される薬剤の量

・頻度等の影響が強く反映されているものと考えられる。また、糞便中の大腸菌は経口的に長期投与される薬剤の選択的圧力により耐性菌出現には一定の傾向がみられる⁷⁾ことも明らかとなっているので、予防薬剤連続投与後の治療薬剤の選択等に際しては慎重な検討が必要と思われる。

さらに、家畜に抗生剤を投与することにより、その近接者に耐性大腸菌を増加させるとの報告もみられる¹³⁾ので、人畜非共通性(分離型)薬剤の導入についても検討されるべきであろう。さらに、これら家畜生体内で増加した耐性菌は、その環境をも濃厚に汚染しており⁹⁾、その無限な汚染領域を考えると公衆衛生・食品衛生¹⁰⁾上決して等閑視できない重要課題となりつつあり、化学療法剤の使用にあたってはより高次の立場から考えなおさざるをえないと言えよう。

Figure-1 Isolation frequency of drug-resistant bacteria and R⁺ strains.



a) Total number of animals excreted *E. coli* strains.

引 用 文 献

- 1) ANDERSON, E. S., and LEWIS, M. J. (1965). Drug resistance and its transfer in *Salmonella typhimurium*. *Nature*. 206, 579~583.
- 2) BUCHANAN, R. E., and GIBBONS, N. E. (1974). *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th Ed.
- 3) DAVIES, J. E., and ROWND, R. (1972). Transmissible multiple drug-resistance in *Enterobacteriaceae*. *Science*, 176, 758-768.
- 4) GUINEE, P. A. M. (1971). Bacterial drug resistance in animals. *Annals of*

the New York Academy of Sciences,
182, 40~51.

- 5) 金井久, 鈴木要, 清水健. (1981). 最近の養豚領域における大腸菌の化学療法剤耐性とRプラスミドの分布, 日獣会誌, 34, 62~67.
- 6) KANAI, H., HASHIMOTO, H., and MITSUHASHI, S. (1981). Drug-resistance and conjugative R plasmids in *Escherichia coli* strains isolated from wild birds (Japanese tree sparrows, Green pheasants and Bamboo partridges), *Jap. Poult. Sci.*, 18, 234~239.
- 7) 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.
- 8) 金井久, 三橋進. (1981). 熟齢動物(種鶏, 種豚, 乳牛, ヒト)から分離された大腸菌の薬剤耐性とRプラスミド, 第91回日本獣医学会講演要旨, P. 117.
- 9) 金井久. (1980). 畜舎汚水(主に菌数と耐性菌)を指標とした環境汚染の実態, 日本獣医畜産学会(関東)講演要旨, P. 91.
- 10) 金井久. (1981). 食鳥処理場から分離された大腸菌の化学療法剤感受性とRプラスミド, 獣畜新報, No. 714, 35~39.
- 11) 鈴木要, 磯貝誠吾, 橋本一, 三橋進. (1967). 幼豚より分離された薬剤耐性大腸菌とそのR因子について, 日本細菌学雑誌, 22, 146~150.
- 12) TANAKA, T., NAGAI, Y., HASHIMOTO, H., and MITSUHASHI, S. (1969). Distribution of R factors among *Shigella* strains isolated in Japan. *Japan. J. Microbiol.*, 13, 187~191.
- 13) WELLS, D. M., and JAMES, O. B. (1973). Transmission of infectious drug resistance from animals to man, *J. Hyg.*,

(Camb)., 71, 209~215.

(質問: 帯広畜大佐藤儀平) いま示された最後の表で, 1つの株でいくつかのRプラスミドがあるように記載されていたが, そうか。

(答) 1つの株で3種類のプラスミドが混在するものもあった。

(座長: 寺門誠致) 以上(1)~(3)の3名の講演の内容を要約すると次の通りとなる。

まず(1)の金城氏の成績では飼料安全法施行前後において, 耐性菌の検出率が低下したような成績であったが, それほど大きな差ではない。ただし野外の豚では耐性菌の検出率が週齢の増加とともに多剤耐性化し, R⁺菌の検出率も高くなっている。一方鶏の場合, 幼すう期に耐性菌の率が高いが日齢がすすむと多剤耐性であったものが単純化してくること, しかしR⁺株の検出率は日齢とともに高まってゆくこと, これには環境の耐性大腸菌の汚染が関与しているのではないかと考えられること, 同様のことがモシカの場合にも認められる点などがあげられよう。

(2)の中村氏の場合, 実験室内の成績だが, ヒナはフ化時にすでに耐性大腸菌により汚染されていること, そのときすでに多剤耐性菌がかなり認められること, それが日齢がすすむと単剤耐性菌に変わってくるが, この点は金城氏の成績と類似している。ただし(環境の)条件をきれいにしておけば全般的に耐性化は低くおさえられること及び日齢とともに環境からの影響が高くなるのではないかと, という点に要約されよう。

(3)の金井氏の成績では群馬地区における耐性菌の検出率をしらべているが, 家畜では耐性の率もR⁺菌の検出率も高い。一方, 人の幼児の大腸菌の場合には耐性菌の検出率が低いのが特徴で, 家畜の場合には幼若期の薬剤投与による選択作用が耐性菌の高率化に関係しているものとみられる。