

2. 鶏の加齢および飼育環境の変化に伴う耐性大腸菌の変動

中 村 政 幸

(農林水産省動物医薬品検査所)*

我国の鶏における耐性大腸菌の調査は数多く報告されているが、抗菌剤を含まない飼料を用いて餌付前から経時的に長期にわたり耐性大腸菌の消長を追求した報告は少ない。そこで、ブロイラーの初生ヒナを用い餌付前から経時的に180日齢までクロアカより大腸菌を分離して耐性菌の動向を調べるとともに、ふ卵器の綿毛あるいは餌付前のクロアカから分離された耐性大腸菌の滞留性を血清学的にも検討した。さらに、ヒナを清浄な環境で飼育後耐性大腸菌の常在している環境へ移動させその間の耐性型および血清型の変動も調べた。

1. 加齢に伴う耐性大腸菌の変動

ふ化した翌日当所へ搬入された初生ヒナ5羽を供試し、経時的に毎回1羽当たり10株の大腸菌をクロアカより分離した。また、これらのヒナがふ化したふ卵器の綿毛からも大腸菌を分離した。耐性菌の検索は常用6薬剤すなわち、塩酸

オキシテトラサイクリン (OTC)、クロラムフェニコール (CP)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、スルファジメトキシン (SA)、カナマイシン (KM)、アミノベンジールペニシリン (AM, ABPCと同じ) を用いて、またRプラスミドの検出は受容菌として、*E. coli* ML 1410 NA^Fを用いて常法通り行った。血清学的検討は綿毛および餌付前のクロアカ由来大腸菌でそれらのO抗原に対する免疫血清を作製し、反応はマイクロタイター法で行なった。

50日齢までの耐性大腸菌の消長をTable 1に示す。綿毛から増菌培養で6株の耐性大腸菌と1株の感受性大腸菌が分離され、耐性大腸菌の耐性型は (OTC・DSM・AM), (DSM・SA・AM), (OTC・DSM) であった。餌付前の分離株の大部分は耐性菌で (OTC・DSM) 耐性株が半数以上を占め、次いで (OTC・DSM・SA) 耐性株が多く、これらの耐性型と綿毛由来株の耐性型では (OTC・DSM) 耐性が一致してい

Table 1. Fluctuation of drug-resistant *Escherichia coli* strains in broiler chickens reared from 1 to 50 days old

Resistance patterns	Fluff	Before feeding	Days after hatching							Total No. of strains
			2	7	12	20	30	40	50	
OTC DSM SA AM		6 ^a	1 ^a 3 ^b 2	3 ^b	15 ^b 1					25
OTC DSM SA						10 ^c 15				31
OTC DSM AM	1 ^c 1 ^d 1		11 ^a	20 ^a 1	8 ^a 3					43
DSM SA AM	1 ^b				2 ^a 6					8
OTC DSM	2 ^a	14 ^a 1	27 ^a	7 ^a	3 ^a	7 ^a			1 ^a	60
OTC SA					3	5 ^c 1 ^d 6	16 ^c 3 ^d 22	25 ^c 3 ^d 11		97
DSM SA					11	11	9	1 ^d 7		39
DSM AM				1 ^a 8	4 ^d 27	3				43
Others		6								6
Sensitive strains	1	3	12	7	2	2				26
Total No. of strains	7	30	50	50	50	50	48	50	50	378
Resistance frequency (%)		93	76	84	96	96	100	100	100	

* No. of strains.
a, b, c and d: Serovar.

*研究協力者：吉村治郎，小林鉄雄（農林水産省動物医薬品検査所），佐藤静夫（農林水産省家畜衛生試験場）

た。その後、耐性大腸菌はかなり高い頻度で推移し、とくに30～50日目では100%を示した。その間(OTC・SA)耐性を示す株が最も多く、以下(OTC・DSM), (OTC・DSM・AM), (DSM・AM), (DSM・SA), (OTC・DSM・SA)耐性の順で、初期には(OTC・DSM), (OTC・DSM・AM), (DSM・AM)耐性株が多く、その後(OTC・SA), (DSM・SA)耐性株が多くなり、耐性型は加齢に応じて変化していく傾向がみられた。また、Rプラスミドは綿毛および餌付前のクロアカ由来株も含めて(OTC・DSM・SA・AM), (OTC・DSM・SA) (OTC・DSM・AM), (DSM・SA・AM)耐性菌の大部分から検出された。したがってRプラスミド保有菌は餌付前および30日目までの分離菌の約半数を占めた。しかし、40～50日目の2剤、単剤耐性菌にはほとんど認められなかった。

血清学的に検討した結果もTable 1に示す。同一O抗原群に属する大腸菌はそれぞれa～dの記号で示し、記号のないものは他のO抗原群に属するか自己凝集株を示す。綿毛由来大腸菌はa～dの4種類の血清型を示した。餌付前に分離された耐性大腸菌の約半数は綿毛由来株中にみられた血清型aと同一の血清型を示し、その後12日目まではこの血清型を示す耐性大腸菌

が優勢となり、それと相前後して順次他の3種類の血清型(b, c, d)を示す耐性大腸菌が出現し、耐性大腸菌は血清学的にも変化しつつ推移する傾向がみられた。なお、50日目までの分離菌の約半数が綿毛由来耐性大腸菌と同一の血清型を示していた。

180日齢までの耐性大腸菌の消長をTable 2に示す。50日目に100%の頻度で分離された耐性大腸も70日目以降加齢に伴いゆるやかに減少し、150日目、180日目には約50%の頻度を示した。耐性型をみると(OTC・SA)耐性が最も多く全期間を通じて認められたが、他の耐性型は散発的に出現しているものが多く、また、50日目以前にみられた3剤、4剤耐性菌も減少しており、50日目までの成績と同様耐性型は加齢に伴いかなり変動しているものと考えられた。また、Rプラスミドはわずかに70日目の(OTC・CP・AM)耐性株の一部に認められたのみであった。

血清学的にみると、綿毛由来菌にみられた4種類の血清型のうち、a, bと同一の血清型を示す耐性大腸菌は認められず、c, dと同一の血清型に属する耐性大腸菌も70日目から180日目までの全供試株240株中10株と非常に減少しており、血清学的にも耐性大腸菌は入れ変っ

Table 2. Fluctuation of drug-resistant *Escherichia coli* strains in broiler chickens reared from 70 to 180 days old

Resistance patterns	Fluff	Days after hatching				Total No. of strains	
		70	90	120	150		
OTC CP AM		1 ^c 8			3	5	17
OTC DSM SA				20			20
OTC DSM AM	1 ^c 1 ^d 1*						
DSM SA AM	1 ^b					2 ^c	2
OTC DSM	2 ^a						
OTC SA		46	2 ^d 18	3	10	8	87
OTC				1 ^c	6	8	15
SA			13	12			25
Sensitive strains		4	8	14	3 ^c 1 ^d 17	27	74
Total No. of strains		50	50	50	40	50	240
Resistance (%) frequency		92	84	72	48	46	

* No. of strains.

a, b, c and d: Serovar.

ていることを示している。

2. 飼育環境の変化に伴う耐性大腸菌の変動

ホルマリンくん蒸したふ卵器でふ化した8羽のヒナを家畜衛生試験場の隔離飼育施設で21日間飼育後、動物医薬品検査所へ移動させ、糞中に耐性菌を高頻度に排出している採卵鶏に近接

させたケージで82日目まで飼育し、その間の耐性大腸菌の変動を調べた。飼料、水は滅菌せず給与した。Table 3 に示す通り、餌付前のふ化1日目に増菌培養で8羽中2羽から耐性大腸菌が分離されたが、移動前における耐性大腸菌の出現頻度は非常に低く、とくに14日目には検出されず、移動直後の21日目に16.3%の頻度を

Table 3. Fluctuation of drug-resistant *Escherichia coli* strains in broiler chickens reared at different environments

Resistance patterns	Days after hatching**									Total No. of strains
	1***	7	14	21	24	28	35	42	82	
OTC				12 ^f	26 ^f ₁	13 ^f ₉ ^e ₂	12 ^f	12 ^f	8 ^f ₃	98
OTC DSM	20* ^e	2 ^e		1 ^e		4 ^e				7
DSM SA							1 ^g			1
OTC CP AM									5 ^h ₁	6
OTC SA KM						9 ⁱ	4 ⁱ ₁			14
Sensitive strains		78 ^j	80 ^j	67 ^j	41 ^j ₁₂	12 ^j ₃₁	13 ^j ₄₉	10 ^j ₅₈	1 ^j ₆₂	514
Total No. of strains		80	80	80	80	80	80	80	80	640
Resistance frequency (%)		2.5	0	16.3	33.8	46.3	22.5	15.0	21.3	

* No. of strains.

** These birds were reared at National Institute of Animal Health up to 21 days old and then at National Veterinary Assay Laboratory up to 82 days old.

*** *E. coli* strains were isolated by enrichment culture. e, f, g, h, i and j: Serovar.

示した。移動後耐性大腸菌はやや増加し、28日目には46.3%の頻度を示したが、その後漸減し82日目には21.3%を示した。

耐性型をみると、移動前はほとんどが(OTC)単剤耐性菌で移動後も(OTC)単剤耐性菌は82日目まで優勢であったが、移動1週目で降新たに(OTC・CP・AM)、(OTC・SA・KM)等の耐性型を示す大腸菌が出現した。これらの耐性菌のO抗原群は相互に異なっているばかりでなく、移動前からみられた耐性大腸菌とも異なっていた。また、感受性大腸菌についても、移動前に検出された菌株はすべて同一のO抗原群に属していたが、移動後は加齢に伴ってその出現頻度は低下し、他のO抗原群の菌株と置換される傾向を示した。なお、Rプラスミドは餌付前にみられた(OTC・DSM)耐性株および移動後にみられた(OTC・DSM・AM)耐性株すべてと28日目の(OTC)耐性株の一部に

認められた。

以上のように、抗菌剤を含まない飼料を用いて餌付前から経時的に長期にわたり耐性大腸菌の変動を追求したところ、ヒナはすでに餌付前からRプラスミド保有菌を含む耐性大腸菌の汚染を受けていることが明らかにされた。そこで、ふ卵器そのものが耐性大腸菌によって汚染されているのではないかと考え、そのふ卵器の耐性菌汚染の指標として綿毛を調べたところ、分離された大腸菌はRプラスミド保有菌を含む耐性菌であり、これらふ卵器の綿毛由来菌と同一の血清型、同一の耐性型を示す耐性大腸菌が餌付前のクロアカ由来菌中にみられた。したがって、餌付前のヒナの耐性大腸菌による汚染の源はふ卵器の可能性が強い。換言すれば、ヒナに定着し、正常フローラの形成に関係する大腸菌がふ卵器由来の耐性大腸菌ではないかと考えられる。

一般に new born の消化管に定着する細菌は母獣の糞便由来と考えられている¹⁾が、本実験の大腸菌に関しては、ふ卵器を汚染していた耐性大腸菌が母獣の糞便中の大腸菌の役割をある程度果しているものと考えられる。このふ卵器を汚染していた綿毛由来あるいは餌付前のクロアカ由来耐性大腸菌の滞留性は比較的すぐれており、50日目までは major として分離された。しかし、70日目以降著しく減少し、180日目には50株中わずかに2株となった。この間、耐性型も初期に多くみられた3剤、4剤耐性菌が加齢とともに減少し、変って単純な耐性型を示す耐性菌および感受性菌が増加した。このような抗菌剤を使用していない場合の耐性大腸菌の変動にはそれぞれの大腸菌の血清型が関係していることをHoweら²⁾は指摘している。

一方、ヒナのふ卵器内汚染を避けるため、ホルマリンくん蒸したふ卵器でふ化させ、その後清浄な隔離飼育施設で飼育すると多少のRプラスミド保有菌はみられるものの耐性大腸菌の出現頻度はかなり低く、耐性型も単純になった。したがって、飼育環境を清浄にすることは耐性大腸菌による汚染の防止にある程度有効と考えられる。なお、この清浄環境下で飼育したヒナを耐性菌の常在している環境へ移動すると異なった耐性型、血清型を示す大腸菌が出現し、耐性菌も一時的に増加するがそれでも前述の通常環境下で飼育された場合に比べると耐性菌の出現頻度は低かった。

なお、公衆衛生上問題とされるRプラスミド保有菌は餌付前から分離されたものの30日目以降減少し、70日目にもわずかししか分離されなかった。また、環境を変えて飼育した場合も42日目以降分離されなかった。したがって、ブロイラーの出荷時期(60~70日齢)にはRプラスミド保有菌は少なく、LINTONら³⁾およびLEVYら⁴⁾が指摘しているようなRプラスミドのヒトへの伝播の危険は少ないものと考えられる。しかし、

Rプラスミド保有菌は少ないとは言え、薬剤添加平板を利用すれば分離可能なので、このような時期に薬剤を投与すればただちにRプラスミドを保有する耐性菌が多数出現することは十分考えられる。薬剤の使用には十分留意する必要がある。

文 献

- 1) SMITH, H. W. (1965). The development of the flora of the alimentary tract in young animals. *J. Pathol. Bacteriol.* **90**, 495-513.
- 2) HOWE, K., LINTON, A. H. and OSBORNE, A. D. (1976). The effect of tetracycline on the coliform gut flora of broiler chickens with special reference to antibiotic resistance and O-serotypes of *Escherichia coli*. *J. Appl. Bacteriol.* **41**, 453-464.
- 3) LINTON, A. H., HOWE, K., BENETT, P. M., RICHMOND, M. H. and WHITESIDE, E. J. (1977). The colonization of the human gut by antibiotic resistant *Escherichia coli* from chickens. *J. Appl. Bacteriol.* **43**, 465-469.
- 4) LEVY, S. B., FITZGERALD, G. B. and MACONE, A. B. (1976). Spread of antibiotic-resistant plasmids from chicken to chicken and from chicken to man. *Nature*. **260**, 40-42.