

# 鶏由来大腸菌における薬剤耐性の疫学

村瀬敏之

鳥取大学農学部獣医学科獣医微生物学教育研究分野（〒 680-8553 鳥取市湖山町南 4-101）

## 1. はじめに

食用動物における抗菌性物質の使用は、各種細菌に薬剤耐性菌株の選択および増加をもたらす要因である。このことは治療効果を低下させる原因となるのみならず、耐性菌が食物連鎖を介して人に伝播する可能性をも示唆することから、公衆衛生学分野の関心が高まっている。したがって、食用動物における抗菌性物質の使用が薬剤耐性菌の出現にどの程度かかわっているのか、また食用動物から分離される耐性菌が人の健康に対しどの程度のリスクとなっているのかを議論するために、食用動物から分離される菌における薬剤耐性動向をモニタリングすることが重要である。わが国においては、家畜衛生分野における抗菌性物質耐性調査の体制として Japanes Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring System (JVARM) が 1999 年より開始された [17]。

大腸菌 (*Escherichia coli*) は、家禽の腸内菌叢を形成する菌種と考えられるので、長期間にわたり本菌における薬剤耐性の調査が可能であるほか [18]、本菌の調査により病原菌における薬剤耐性を予見できる可能性がある [1]。これまでもブロイラーにおける抗菌性物質の使用が、糞便中の薬剤耐性大腸菌の分離頻度に及ぼす影響が検討されている [4, 5, 15]。一方で、発育段階に応じて調製された配合成分の異なる飼料が順次給与されるほか、疾病対策のために抗菌性物質が使用される場合がある。そこで、ブロイラーの各発育段階における耐性遺伝子のリザーバーとしての大腸菌耐性菌の分布、一頭中その耐性菌の構

成、同一農場内の個体差の把握を目的として、抗菌性物質を使用した農場と過去 1 年以上使用していない農場において飼養期間中に複数回糞便を採取し、1 羽の糞便より分離された 10 菌株を薬剤感受性試験およびパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法による型別に供した。

## 2. 材料および方法

### (1) 検体採取

調査対象 4 農場のうち、2 農場（農場 1 および 2）では、飼養期間を通じ飼料添加物および動物用医薬品としての抗菌薬を使用していなかった。また、過去 1 年以上使用歴がない。農場 3 では 14 日齢以降 7 日間にわたり動物用医薬品として、200 ppm のオキシテトラサイクリン (OTC)、500 ppm のスルファジメトキシシン (SDMX) および 300 ppm のタイロシンを添加した飼料が給与された。農場 4 では 20 日齢以降 3 日間にわたり動物用医薬品として、500 ppm の SDMX を添加した飼料が給与された。農場 1、2 および 4 では開放鶏舎、農場 3 ではウインドウレス（無窓）鶏舎においてブロイラー鶏が飼養された。

糞便検体は、2 から 3 日齢（若齢期）、14 から 17 日齢（成長期）（農場 3 および 4 では、抗菌性物質を使用する前）および 47 から 50 日齢（出荷前）に採取した。排出されて間もない糞便を 10 検体採取し、キャリアブレイア培地を用いて 4°C で輸送した。

### (2) 大腸菌の分離

各糞便検体を DHL 培地に塗布し培養した。大

腸菌を疑うコロニーを釣菌し、API20E を用いて同定した、1 検体当たり 10 菌株を以降の実験に供した。

(3) 薬剤感受性試験

Clinical Laboratory Standards Institute [2] に準拠し、平板希釈法により行った。ブレイクポイントは既報 [10] に基づき、アンピシリン (ABPC) : 32mg/L, セファゾリン (CEZ) : 32 mg/L, セフトオフル (CTF) : 8 mg/L, ジヒドロストレプトマイシン (DSM) : 32mg/L, ゲンタマイシン (GM) : 16 mg/L, カナマイシン (KM) : 64 mg/L, OTC : 16 mg/L, クロラムフェニコール (CP) : 32 mg/L, ナリジクス酸 (NA) : 32 mg/L, エンロフロキサシン (ERFX) : 2 mg/L, トリメトプ

リム (TMP) : 16 mg/L とした。SDMX のブレイクポイントは設定がない。

(4) PFGE

既報 [16] に基づき試料を調製し、*XbaI* あるいは *SpeI* 切断パターンの比較を行った。菌株間の遺伝的近縁性を評価した [12, 13]。

3. 結果

分離株における各薬剤の MIC 値の分布ならびに耐性菌株数および耐性菌を保有していた鶏の羽数を表 1 に示した。

ABPC の MIC が 512 mg/L 以上である菌株がすべての農場において分離された。農場毎の、全

表 1 分離菌株に対する各薬剤の MIC 分布ならびに耐性菌株数および耐性株を保有していた鶏の羽数

農場	採材時期	ABPC	CEZ	CTF	DSM	KM	GM	OTC	CP	NA	ERFX	TMP
1	若齢期	0.5->512 <sup>a</sup> 19 (6) <sup>b</sup>	0.5->512 8 (4)	<0.13-16 8 (4)	2-512 6 (3)	1->512 1 (1)	0.5-64 3 (2)	1-512 38 (8)	4-256 4 (2)	1->512 1 (1)	<0.13-16 1 (1)	<0.13->512 6 (4)
	成長期	1->512 46 (9)	1->512 22 (9)	<0.13-256 15 (7)	2->512 41 (10)	2->512 10 (4)	1-128 22 (9)	1-512 57 (10)	2-256 6 (2)	1-512 25 (9)	<0.13-1 0 (0)	<0.13->512 4 (3)
	出荷前	0.5->512 49 (7)	0.5->512 19 (7)	<0.13-16 15 (6)	2->512 25 (8)	2->512 2 (1)	0.5-32 1 (1)	1-256 45 (10)	2-8 0 (0)	1->512 8 (4)	<0.13-16 3 (2)	<0.13->512 13 (6)
2	若齢期	0.5->512 54 (8)	0.5->512 42 (8)	<0.13-512 39 (7)	1->512 27 (7)	1->512 15 (6)	0.25-128 10 (3)	1-512 53 (9)	2-256 10 (3)	2->512 16 (6)	<0.13-8 11 (4)	0.25-2 0 (0)
	成長期	1->512 40 (9)	1->512 1 (1)	<0.13-16 1 (1)	4->512 21 (8)	2->512 18 (7)	0.5-2 0 (0)	1-512 29 (8)	2-512 18 (8)	0.5->512 17 (7)	<0.13-128 16 (7)	<0.13->512 23 (7)
	出荷前	1-512 72 (10)	1->512 55 (9)	<0.13-8 55 (9)	4->512 30 (7)	1-512 10 (5)	0.5-1 0 (0)	0.5-512 78 (10)	2-128 3 (3)	1->512 10 (5)	<0.13-16 7 (4)	<0.13->512 19 (5)
3	若齢期	1-512 68 (8)	1-4 0 (0)	<0.13-0.5 0 (0)	32->512 100 (10)	1->512 51 (6)	0.25-2 0 (0)	64-512 100 (10)	2-512 9 (4)	1-256 3 (1)	<0.13-0.5 0 (0)	0.25->512 16 (3)
	成長期	0.25->512 26 (7)	<0.13->512 2 (2)	<0.13-16 2 (2)	64->512 100 (10)	1->512 16 (4)	0.5-4 0 (0)	64-512 100 (10)	2-512 5 (5)	1-128 35 (9)	<0.13-0.5 0 (0)	<0.13->512 11 (3)
	出荷前	0.25->512 44 (9)	<0.13-512 1 (1)	<0.13-8 1 (1)	16->512 74 (10)	2->512 3 (1)	1-2 0 (0)	128-512 100 (10)	4-64 37 (8)	2->512 58 (10)	<0.13-2 1 (1)	<0.13->512 17 (7)
4	若齢期	2->512 95 (10)	<0.13-16 0 (0)	<0.13-0.5 0 (0)	4->512 90 (10)	1-4 0 (0)	0.5-1 0 (0)	1->512 67 (10)	1-32 1 (1)	1->512 10 (1)	<0.13-16 10 (10)	0.5->512 47 (9)
	成長期	1->512 47 (7)	0.5-512 1 (1)	<0.13-8 1 (1)	4->512 59 (9)	1->512 4 (3)	0.5-2 0 (0)	1-256 49 (8)	2-64 10 (1)	2->512 11 (5)	<0.13-16 8 (2)	<0.13->512 2 (1)
	出荷前	1->512 72 (10)	1-256 2 (2)	<0.13-8 2 (2)	4->512 60 (9)	2->512 20 (7)	1->512 1 (1)	1-512 70 (9)	4-128 20 (8)	2->512 34 (9)	<0.13-16 15 (7)	<0.13->512 12 (4)

a MIC (mg/L) の範囲

b 耐性菌株数および括弧内に耐性株を保有していた鶏の羽数を示す

調査期間において分離された菌株に占める ABPC 耐性株の割合は 38% から 71% であった。農場 1 および 2 において分離された ABPC 耐性菌株の半数以上は、ABPC に加え CEZ および CTF にも耐性を示した。一方、農場 3 および 4 において分離された菌株の大多数は CEZ および CTF に感受性であった。農場 1 および 2 で分離された CTF 耐性株においてみられたもっとも高い MIC は 256 あるいは 512 mg/L と、農場 3 および 4 由来株における値 (8 あるいは 16 mg/L) の 32 倍であった。

農場 3 および 4 において分離された菌株のうち半数以上が DSM 耐性株で、農場 1 および 2 に比べ多数分離された。DSM と同じくアミノグリコシド系薬である KM に耐性を示す株は、すべての農場で分離された (4.3% から 23.3%)。一方、もうひとつのアミノグリコシド系薬である GM に耐性を示す株の分離頻度は農場 1 で 8.7% であったのに対し、農場 2 (3.1%) および農場 4 (0.3%) では低く、農場 3 では分離されなかった。

OTC 耐性株は農場 1, 2 および 4 で分離された菌株の 46% から 62% を占めていた。農場 3 で分離された菌株のすべてが OTC に耐性を示した。

CP, NA 又は TMP に耐性を示した菌株はすべての農場で分離され、その頻度は 3.3% から 20.3% とばらついた。農場 2 および 4 において分離された菌株の、それぞれ 10% 以上が ERFX に耐性を示したが、農場 1 および 3 由来株においては数菌株に過ぎなかった。

農場 1 および 2 において分離された各発育段階において分離された菌株の 40 から 100% において、SDMX の MIC が 512 mg/L より高かった。このような高い MIC を示す菌株に加え、成長期および出荷前に分離された菌株における MIC の分布は、128 あるいは 256 mg/L にピークを認めた。農場 3 および 4 において分離された菌株では、1 株を除き SDMX の MIC が 128 mg/L 以上であった。また、発育段階ごとに 74% から 100% の菌株において MIC が 512 mg/L より高かった。

2 薬剤から 7 薬剤に対し耐性の、多剤耐性株がすべての農場で分離された (表 2 ~ 5)。農場 2 では、8 薬剤から 10 薬剤に耐性である菌株が分

離された。また、農場 3 で分離された株のすべてが多剤耐性であった。農場 1 および 2 で飼養された鶏より分離された菌株において、日齢とともに多剤耐性株が多数分離される傾向にあった。今回分離されたすべての多剤耐性株は、ABPC, DSM あるいは OTC のいずれかに耐性であった。

2 剤耐性株では、総計 10 の耐性パターン (耐性を示す薬剤の組み合わせ) が認められた。そのうち 9 つのパターンが農場 1 由来株、また、5 つが農場 2 由来株で認められた。一方、農場 3 で分離された 2 剤耐性株のすべてが DSM および OTC 耐性、また、農場 4 で分離された 2 剤耐性株の大多数 (13/16) が DSM および CP 耐性株であった。3 剤耐性株のうち、ABPC, CEZ および CTF に耐性のものは農場 1 および 2 のみで認められた。これに対し、農場 3 および 4 において認められた 3 剤耐性株の耐性パターンは、ABPC, DSM および他の 1 剤あるいは DSM, OTC および他の 1 剤であった。すべての農場で分離された ERFX あるいは TMP 耐性株の大多数は、他の 2 剤以上に同時に耐性を示した。

発育段階を通じて分離され、同じ耐性パターンを示し遺伝的に近縁である菌株が認められた。農場 1 で若齢期、成長期および出荷前のそれぞれの時期に分離された ABPC および OTC の 2 剤耐性株に、PFGE パターンが同一であることを認めた (図 1)。しかし、当該農場で異なる発育段階で分離された、DSM および OTC 耐性株には PFGE パターンが同一であることを認めなかった。

農場 4 において分離された菌株のうち、ABPC, DSM, OTC, NA および ERFX の 5 剤耐性株、ABPC, DSM, OTC, NA, ERFX および CP の 6 剤あるいは ABPC, DSM, OTC, NA, ERFX および TMP の 6 剤に耐性の株の PFGE パターン解析の結果、これらは遺伝的に近縁であった。5 剤耐性株が CP および TMP 耐性遺伝子を獲得したものと思われた (図 2)。したがって、これらの菌株は、3 剤耐性株が DSM および OTC 耐性遺伝子を獲得した可能性が示唆された。同様の成績は、農場 2 において分離された菌株でも認められた。すなわち、ABPC, CEZ および CTF の 3 剤に耐性である菌株、ABPC, CEZ, CTF および

表2 農場1より分離された大腸菌株における薬剤耐性パターン

耐性 薬剤数	耐性パターン	採材時期		
		若齢期	成長期	出荷前
1 剤	ABPC	4	4	5
	OTC	20	3	14
2 剤	ABPC-CEZ		5	1
	ABPC-DSM			7
	ABPC-OTC	4	19	6
	DSM-KM		7	
	DSM-OTC	1	1	3
	GM-OTC	3		
	OTC-CP	1		
	OTC-TMP		1	
	OTC-NA			1
3 剤	ABPC-CEZ-CTF	2	10	14
	ABPC-CEZ-OTC		1	1
	ABPC-DSM-OTC		1	
	ABPC-OTC-TMP	3		
	DSM-OTC-TMP	2		
	DSM-OTC-CP		1	
	OTC-NA-ERFX			2
4 剤	ABPC-CEZ-CTF-OTC	1		
	ABPC-CEZ-CTF-DSM		1	
	DSM-GM-OTC-NA		22	
	DSM-KM-OTC-NA		3	
	ABPC-CEZ-OTC-NA			2
	ABPC-DSM-OTC-TMP			12
	DSM-KM-OTC-TMP			2
	DSM-GM-OTC-TMP			1
5 剤	ABPC-CEZ-CTF-CP-TMP	1		
	ABPC-CEZ-CTF-DSM-CP	1		
	ABPC-CEZ-DSM-OTC-CP		1	
6 剤	ABPC-CEZ-CTF-DSM-OTC-CP	1	1	
	ABPC-CEZ-CTF-DSM-OTC-KM	1		
	ABPC-CEZ-CTF-OTC-NA-ERFX	1		1
7 剤	ABPC-CEZ-CTF-DSM-OTC-CP-TMP		3	

表 3 農場 2 より分離された大腸菌株における薬剤耐性パターン

耐性 薬剤数	耐性パターン	採材時期		
		若齢期	成長期	出荷前
1 剤	ABPC		15	
	OTC	3		10
	DSM			1
2 剤	ABPC-CEZ	2		
	ABPC-OTC	11	1	6
	DSM-OTC		2	
	GM-OTC	1		
	OTC-NA		1	
3 剤	ABPC-CEZ-CTF	8		15
	ABPC-CEZ-OTC	1		1
	ABPC-DSM-OTC			1
	ABPC-OTC-TMP		5	2
	ABPC-DSM-TMP			1
	DSM-KM-OTC		1	9
4 剤	ABPC-CEZ-CTF-OTC	10	1	29
	DSM-KM-OTC-NA	5		
	ABPC-DSM-OTC-TMP			6
	DSM-OTC-NA-ERFX			6
5 剤	ABPC-CEZ-CTF-DSM-OTC	11		1
	ABPC-DSM-OTC-NA-ERFX	1		
	ABPC-CEZ-CTF-CP-TMP			3
	ABPC-CEZ-CTF-OTC-TMP			3
	ABPC-DSM-OTC-CP-TMP		1	
6 剤	ABPC-DSM-KM-OTC-CP-TMP		1	
	ABPC-DSM-OTC-NA-ERFX-TMP			1
	ABPC-CEZ-CTF-DSM-KM-OTC			1
7 剤	ABPC-CEZ-CTF-DSM-OTC-NA-TMP			3
8 剤	ABPC-DSM-KM-OTC-CP-NA-ERFX-TMP		16	
9 剤	ABPC-CEZ-CTF-DSM-KM-OTC-NA-ERFX	1		
10 剤	ABPC-CEZ-CTF-DSM-GM-KM-OTC-NA-ERFX	9		

表4 農場3より分離された大腸菌株における薬剤耐性パターン

耐性 薬剤数	耐性パターン	採材時期		
		若齢期	成長期	出荷前
2 剤	DSM-OTC	32	39	8
3 剤	ABPC-DSM-OTC		16	18
	DSM-KM-OTC		8	2
	DSM-OTC-NA		12	16
	OTC-CP-NA			26
	DSM-OTC-TMP			2
4 剤	ABPC-DSM-KM-OTC	51	2	1
	ABPC-DSM-OTC-CP	1		2
	ABPC-DSM-OTC-NA		1	
	ABPC-DSM-OTC-TMP	5		8
	DSM-OTC-CP-NA		3	1
	DSM-KM-OTC-NA		6	
	DSM-OTC-NA-TMP		6	
	DSM-OTC-NA-ERFX			1
5 剤	ABPC-DSM-OTC-CP-TMP	8		
	ABPC-DSM-OTC-NA-TMP	3	5	6
	ABPC-DSM-OTC-CP-NA			8
6 剤	ABPC-CEZ-CTF-DSM-OTC-TMP			1
7 剤	ABPC-CEZ-CTF-DSM-OTC-CP-NA		2	

表5 農場4より分離された大腸菌株における薬剤耐性パターン

耐性 薬剤数	耐性パターン	採材時期		
		若齢期	成長期	出荷前
1 剤	ABPC			16
	OTC			8
2 剤	DSM-CP	3	10	
	DSM-OTC			1
	ABPC-OTC			2
3 剤	ABPC-DSM-OTC	38	36	15
	ABPC-DSM-TMP	28		
	ABPC-OTC-TMP	8		
	ABPC-DSM-KM		1	
	DSM-KM-OTC			2
4 剤	ABPC-DSM-OTC-TMP	11	2	
	ABPC-DSM-GM-OTC			1
	ABPC-DSM-OTC-CP			6
	DSM-KM-OTC-NA		3	2
	DSM-OTC-NA-TMP			1
5 剤	ABPC-DSM-OTC-NA-ERFX		7	3
	ABPC-DSM-CP-NA-ERFX	10		
	ABPC-DSM-KM-OTC-NA			7
	ABPC-DSM-OTC-CP-TMP			1
6 剤	ABPC-CEZ-CTF-OTC-NA-ERFX		1	
	ABPC-DSM-OTC-CP-NA-ERFX			4
	ABPC-DSM-OTC-NA-ERFX-TMP			8
	ABPC-DSM-KM-OTC-CP-NA			7
9 剤	ABPC-CEZ-CTF-DSM-KM-OTC-CP-NA-TMP	2		

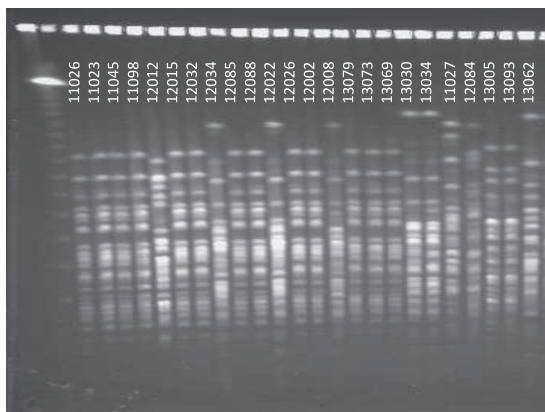


図1 農場1由来大腸菌のPFGEパターン

11000, 12000 および 13000 番台は、それぞれ若齢期、成長期および出荷前に採材した糞便より分離された菌株。レーン左より 11026 から 13034 は、ABPC および OTC の 2 剤耐性株。11027 から 13062 は、DSM および OTC の 2 剤耐性株。

OTC の 4 剤に耐性である菌株、また、ABPC、CEZ、CTF、OTC および DSM の 5 剤に耐性である菌株の PFGE パターン解析の結果、これらは互いに遺伝的に近縁であった (PFGE データ省略)。

1 検体 (1 羽) から分離された 10 株すべてが耐性株であるとは限らない。たとえば、農場 1 において若齢期の 10 羽から分離された 100 株のうち 19 株が ABPC に耐性であったが、ABPC 耐性株を分離した糞便は 6 検体 (6 羽) である。そこで、1 検体由来の 10 菌株における耐性パターン数を算出した。同時期に採取した検体であっても、10 株がすべて同じ耐性パターンである場合と 8 つの耐性パターンを認めた場合もあった。発育段階毎に 10 菌株における耐性パターン数の平均値を比較したところ、加齢とともに耐性パターン数の平均値が増加した (図 3)。

#### 4. 考察

コマーシャル・ブロイラー鶏の腸管内に薬剤耐性大腸菌が存在することが明らかとなった。とくに、抗菌性物質を使用していない鶏群において

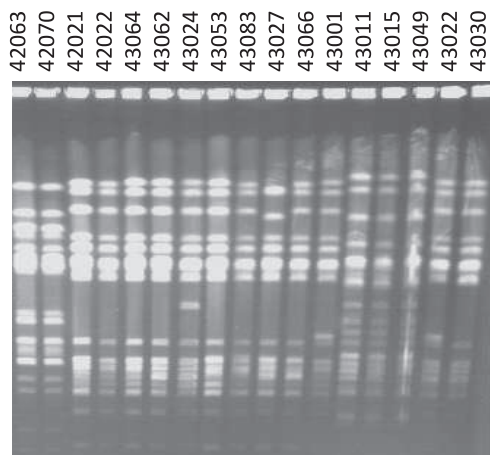


図2 農場4由来大腸菌のPFGEパターン

42000 および 43000 番台は、それぞれ成長期および出荷前に採材した糞便より分離された菌株。レーン左より 42063 から 43062 は、ABPC、DSM、OTC、NA および ERFX の 5 剤耐性株。43024 から 43066 は、ABPC、DSM、OTC、NA、ERFX および CP の 6 剤耐性株。43001 から 43030 は、ABPC、DSM、OTC、NA、ERFX および TMP の 6 剤耐性株。

も、飼養期間を通じて遺伝的に近縁な耐性菌株が存在し続けた。このような菌株は鶏の腸管内に比較的長い期間定着していたか環境中で生存していた可能性が示唆された。実際に、耐性株が農場環境に生存し続け、新しい鶏群に感染したことを示す成績が報告されている [6, 7]。抗菌性物質を使用していない、選択圧のない環境中で耐性菌が存続する要因のひとつとして、鶏に順応し同時に耐性遺伝子を保有する菌株の存在が考えられている [14]。

抗菌性物質の使用の有無に関わらず、鶏の腸管に棲息する大腸菌間における耐性遺伝子の水平伝達の可能性が示唆された。今回の調査で同一農場から分離された、ある耐性パターンを示す菌株と、その菌株が耐性を示す薬剤に加え他の薬剤、すなわち DSM、OTC、CP および TMP、にも耐性である菌株の PFGE パターンが一致した。これらの薬剤に耐性を付与する遺伝子はしばしば、R プラスミド、トランスポゾン、インテグロンなどの可動性因子とともに存在することが知られている [3, 9, 15]。今回の菌株については耐性遺伝子の特定、当該遺伝子の伝達およびそのメカニズムの解明が必要である。

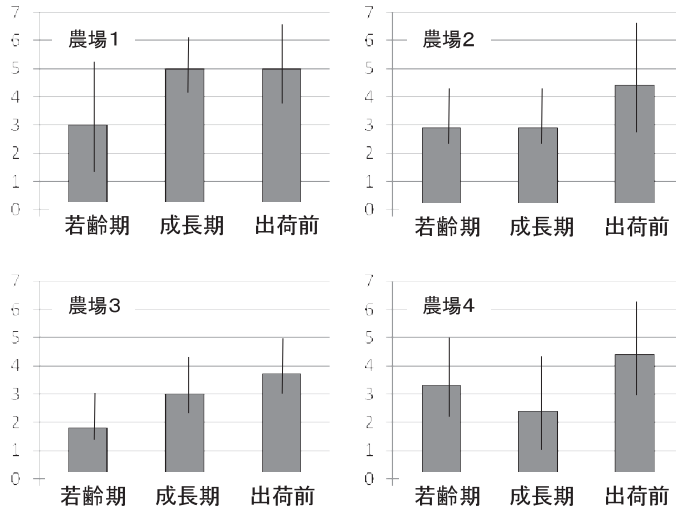


図3 各農場において分離された菌株における耐性パターン数の変化  
横軸の1, 2および3は、それぞれ若齢期, 成長期および出荷前を示す。データは、採材時ごとの1羽由来10株に見られた耐性パターン数の10羽あたりの平均値±標準偏差で示した。

鶏の加齢に伴い、分離菌株における耐性パターン数が増加する、すなわち多様な耐性株を腸管内に保有する可能性が示唆された。とくに農場1および3で使用された鶏においては、14日齢において、すでに多様な耐性株を保有していると思われる。Luら [11] が回腸内および盲腸内の細菌叢が14日齢までの間に変化することを報告している点は興味深い。菌叢の変化が、多様な耐性菌株を腸管内に保有する一要因となっている可能性がある。すなわち、それまで鶏の腸管内に存在しない耐性パターンを示す菌株や耐性遺伝子を保有する菌株を取り込んだ可能性が考えられる。とくに農場3で使用された鶏は、14日齢における採材の後に抗菌性物質を与えられたことから、薬剤の使用が耐性パターンの多様化には直接関与しなかったと思われる。一方、抗菌性物質を与えられなかったブロイラー鶏から分離された菌株における耐性の発現が顕著ではないという報告もある [5]。農場4では20日齢からSDMXが飼養され、この農場の17日齢と47日齢の鶏から分離した大腸菌を比較すると、後者で耐性パターン数が増加している。SDMXとの共耐性がこの現象の要因であった可能性が考えられる [4, 8]。

農場3において分離された菌株のすべてが、とくに、2日齢のヒナから分離した菌においてもOTCに耐性であった。当該農場では調査した鶏群のみならず、1年以上にわたりOTCを使用していること、また、ウインドウレス鶏舎で飼養していることが、OTC耐性菌株の選択および増加あるいは鶏群内における拡散に關与した可能性が示唆された。実験的にOTCを投与した鶏では、投与5週から7週後にOTC耐性大腸菌株の分離頻度が非投与群に比べ高かったという [15]。

今回、1検体(1羽)から分離した10菌株における耐性を検討したところ、同じ鶏群の10羽のあいだにおいても、多様な耐性パターンが認められ、耐性株の網羅的な把握が可能と思われた。一方、鶏群における耐性株の多様性を把握する際は、同一のPFGEパターンを示す同一個体由来株の重複を避ける必要がある。

## 5. まとめ

飼養期間中に抗菌性物質を使用したブロイラー鶏群および使用していない鶏群について、若齢期, 成長期および出荷前の糞便より大腸菌を分離し薬



剤感受性を検討した。すべての農場の鶏群由来大腸菌において、ABPC あるいは OTC に対する耐性菌の分離頻度が高かった。抗菌性物質を使用していない鶏群から、ABPC および OTC の 2 剤に耐性で PFGE により遺伝的に近縁と判断される菌株が発育段階を通じて分離された。抗菌性物質を使用した 1 農場では、遺伝的に近縁で薬剤耐性パターンが異なる菌株が分離されたが、R プラスミドのような可動性の因子が耐性パターンの差異に起因した可能性が示唆された。同様の成績は使用していない 1 農場において分離された菌株においても認められた。同一鶏群より分離された菌株における薬剤耐性パターンは鶏の加齢とともに多様化する傾向にあった。以上の成績より、ブロイラーの飼養期間における抗菌性物質の使用に関わらず、薬剤耐性株が使用期間中鶏群に存在すること、また、R プラスミドのような可動性の因子が薬剤耐性パターンの多様化にかかわっている可能性が示唆された。

## 6. 謝 辞

本研究は、農林水産省の「平成 19 年度抗菌性物質薬剤耐性菌評価情報整備委託事業」において行われた。

## 引用文献

- 1) Aarestrup FM, Bager F, Jensen NE, Madsen M, Meyling A, Wegener HC: Resistance to antimicrobial agents used for animal therapy in pathogenic, zoonotic- and indicator bacteria isolated from different food animals in Denmark: a baseline study for the Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme (DANMAP). *APMIS*, 106, 745-770 (1998)
- 2) Clinical Laboratory Standards Institute. 2006. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A7. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- 3) Cloeckaert A, Baucheron S, Flaujac G, Schwarz S, Kehrenberg C, Martel JL, Chaslus-Dancla E: Plasmid-mediated florfenicol resistance encoded by the *floR* gene in *Escherichia coli* isolated from cattle. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 2858-2860 (2000)
- 4) da Costa PM, Belo A, Gonçalves J, Bernardo F: Field trial evaluating changes in prevalence and patterns of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from growing broilers medicated with enrofloxacin, apramycin and amoxicillin. *Vet Microbiol*, 139, 284-292 (2009)
- 5) da Costa PM, Bica A, Vaz-Pires P, Bernardo F: Effects of antimicrobial treatment on selection of resistant *Escherichia coli* in broiler fecal flora. *Microb Drug Resist*, 14, 299-306 (2008)
- 6) Diarra MS, Silversides FG, Diarrassouba F, Pritchard J, Masson L, Brousseau R, Bonnet C, Delaquis P, Bach S, Skura BJ, Topp E: Impact of feed supplementation with antimicrobial agents on growth performance of broiler chickens, *Clostridium perfringens* and enterococcus counts, and antibiotic resistance phenotypes and distribution of antimicrobial resistance determinants in *Escherichia coli* isolates. *Appl Environ Microbiol*, 73, 6566-6576 (2007)
- 7) Diarrassouba F, Diarra MS, Bach S, Delaquis P, Pritchard J, Topp E, Skura BJ: Antibiotic resistance and virulence genes in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* isolates from commercial broiler chicken farms. *J Food Prot*, 70, 1316-1327 (2007)
- 8) Harada K, Asai T, Kojima A, Ishihara K, Takahashi T: Role of coresistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. *Am J Vet Res*, 67, 230-235 (2006)
- 9) Huovinen P, Sundström L, Swedberg G, Sköld O: Trimethoprim and sulfonamide resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 279-289 (1995)
- 10) Kojima A, Asai T, Ishihara K, Morioka A, Akimoto K, Sugimoto Y, Sato T, Tamura Y, Takahashi T: National monitoring for antimicrobial resistance

- among indicator bacteria isolated from food-producing animals in Japan. *J Vet Med Sci*, 71, 1301-1308 (2009)
- 11) Lu J, Idris U, Harmon B, Hofacre C, Maurer JJ, Lee MD: Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Appl Environ Microbiol*, 69, 6816-6824 (2003)
  - 12) Nei M, Li WH: Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76, 5269-5273 (1979)
  - 13) Nguyen L, Levy D, Ferroni A, Gehanno P, Berche P: Molecular epidemiology of *Streptococcus pyogenes* in an area where acute pharyngotonsillitis is endemic. *J Clin Microbiol*, 35, 2111-2114 (1997)
  - 14) Pleydell EJ, Brown PE, Woodward MJ, Davies RH, French NP: Sources of variation in the ampicillin-resistant *Escherichia coli* concentration in the feces of organic broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*, 73, 203-210 (2007)
  - 15) Smith JL, Drum DJ, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ, Hofacre CL, Lee MD: Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl Environ Microbiol*, 73, 1404-1414 (2007)
  - 16) Someya A, Otsuki K, Murase T: Characterization of *Escherichia coli* strains obtained from layer chickens affected with colibacillosis in a commercial egg-producing farm. *J Vet Med Sci*, 69, 1009-1014 (2007)
  - 17) 高橋敏雄, 浅井鉄夫, 小島明美, 原田和記, 石原加奈子, 守岡綾子, 木島まゆみ, 田村 豊: 家畜衛生分野における耐性菌の現状と今後の対応. *感染症誌* 80, 185-195 (2006)
  - 18) van den Bogaard AEJM, London N, Stobberingh EE: Antimicrobial resistance in pig faecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. *J Antimicrob Chemother*, 45, 663-671 (2000)

### Antimicrobial Susceptibilities in *Escherichia coli* Isolates Obtained from Broiler Chickens

Toshiyuki MURASE

Laboratory of Veterinary Microbiology, Faculty of Agriculture, Tottori University, 4-101 Koyama, 680-8553 Tottori

The use of antimicrobial agents in food-producing animals has increasingly become a public concern. *Escherichia coli* isolates obtained from commercial broiler chickens reared on farms with or without use of antimicrobials during maturation were screened for antimicrobial resistance. Ten *E. coli* isolates were recovered from each of the fecal samples collected from 10 birds on the farms at the ages of 2 to 3 days, 14 to 17 days, and 47 to 50 days. High prevalence of resistance to antimicrobials including ampicillin (ABPC) (19 to 95% by sampling time) and OTC (29 to 100%) was detected on all of the farms. Isolates resistant to both ABPC and OTC that were obtained from an untreated flock at different sampling times were closely related each other by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) patterns of *Xba*I-digested chromosomal DNA. In *E. coli* isolates from farms with or without use of antimicrobials, identical PFGE patterns were found among isolates with certain resistance phenotypes and other isolates that were resistant to additional drugs, including DSM, OTC, CP, and TMP. The numbers of resistance phenotypes observed among isolates from the birds increased with the growth of the chickens. The present results suggest that commensal *E. coli* strains with defined resistance phenotypes may persist in the absence of selective pressure of antimicrobials. It is also implied that horizontal transmission of mobile elements such as R-plasmids result in the emergence of different resistance phenotypes even in the absence of antimicrobial administration.

討 論 (座長：江口正志, 畜安研)

質問 (藤本修平, 東海大)

腸管内での耐性菌は人だと  $10^{-5} \sim 10^{-10}$  という報告文があるので, 便をそのまま選択培地に接種して, 耐性菌の有無を調べるのも興味深いといえます。

- ①ヒヨコの入手源は農場によって異なるか。(チップはどこからきているのか。)
- ②飼育の様態はどういうものか。(ケージか部屋タイプか, どうやって飼っているか。)
- ③糞口感染がある状態か。(餌は糞に汚染されたものを食べているのか。)

答 (村瀬敏之)

- ①孵化場のデータは持っておらず, 今回明らかにしていないが, 3農場は地理的には遠隔であった。雛の入手源は限られている。
- ②プロイラーなので, 1つのフロアーで多数の個体が放し飼いになっている。
- ③餌は餌桶の中に入っているという飼育の様態であり, 餌だけでなく糞も食べていると思われる。農場3はウィンドレス (窓なし) で環境をコントロールされており, これが農場間の違いに関与している可能性はある。

質問 (藤本修平, 東海大)

人間ではごく少ない population が耐性を持っている。そのため, 全体を見るのであれば, 便自体を抗菌性物質含有培地にまいて, 発育してきた菌の同定をする。

答 (村瀬敏之)

調査目的に応じた採材の方法が必要と思います。今回は一個体に由来する複数株における耐性パターンのバラエティーを検討するため10株分離しました。特定の耐性遺伝子をもった菌を見つけない場合, ご指摘のような方法が必要と思います。

質問 (秋庭正人, 動衛研)

薬剤を使用していない農場にも, もともと耐性菌が出ているということだったが, 雛の導入元がそれら耐性菌の供給元となっている可能性は考えられますか。

答 (村瀬敏之)

その可能性は否定できないし, そのような報告は文献にもある。今回はそこまでは遡った調査はできていない。