牛と豚由来病原大腸菌の薬剤感受性と毒素産生性について

末吉益雄・上村涼子・永友寛司

宮崎大学農学部獣医学科獣医衛生学研究室（〒 889-2192　宮崎県宮崎市学園木花台西 1-1）

１．はじめに

子牛および子豚の大腸菌症は発病率あるいは死亡率が依然高く，経済的に大きな損失をもたらす主要な疾病の一つである。その病原大腸菌の中で，志賀毒素産生性大腸菌（STEC）感染は下痢あるいは死亡にも関与している［2-4，6，8-16］。本研究では，下痢発症子牛由来および大腸菌性腸管毒血症発症子豚由来 STEC の薬剤感受性およびその毒素産生について検索した。

２．子牛由来病原性大腸菌の薬剤感受性

（1）材料と方法

2001 年 7 月～ 2005 年 3 月に搬入された 1 日齢～ 8 カ月齢までの下痢を呈した 275 頭の黒毛和種育成子牛について，その糞便あるいは腸管内容物から大腸菌の検出を試みた。採取した材料を CT-sMac 寒天培地に塗抹し，37℃，18 ～ 24 時間培養した。発育菌の集落を白金耳で釣菌し，滅菌蒸留水に懸濁し，加熱した後，遠心し，上清中の DNA を抽出した。PCR にて，*stx1* 遺伝子（stx1-5'-AGCTGAAGCTTTACGTTTTCGG, stx1 - 3'-TTTGCGCACTGAGAAGAAGAGA），*stx2* 遺伝子（stx2 - 5' - TCCATGACAACGGACAGCAGTT，stx 2 - 3' - ATCCTCATTATACTTGGAAAACTCA）および *eaeA* 遺伝子（eae-5'- GCTTAGTGCTGGTTTAGGAT, eae – 3' - TCGCCGTTCAGAGATCGC）を検出した。また，検体を MHB に接種し，37℃，6 ～ 8 時間増菌培養後，前述と同様の方法で分離した。分離された *stx* および *eaeA* 遺伝子保有分離株について，メチルレッド（MR），Voges-Proskauer（VP）反応，クエン酸塩利用，硫化水素産生試験を実施した。*stx* 遺伝子保有大腸菌あるいは *eaeA* 遺伝子保有大腸菌について血清型別および薬剤感受性試験を実施した。*stx* 遺伝子保有大腸菌については，「VTEC-RPLA「生研」」で志賀毒素（Stx）産生を確認した。血清型別には，「病原性大腸菌免疫血清（デンカ生研 . 東京）」を用いた。薬剤としては ABPC，PCG，AMPC，GM，KM，EM，CL，TC，OTC，CP，BCM，FOM，SDMX，OXA，NA，ERFX および NFLX を供試した。最小発育阻止濃度（MIC）測定は，NCCLS 寒天平板希釈法［1］に従った。

（2）結果および考察

採材された糞便の性状は，水様性便が 149 検体（54.2％），泥状便が 78 検体（28.4％）および軟便が 48 検体（17.4％）であった。週齢として，1 週齢以下が全検体の約 25.8％を占め，それらの検体から 160 株の STEC あるいは AEEC が検出された。それらの血清型は O26 が多かった（表 1）。STEC の中では，*stx1* 遺伝子保有株が多かった。薬剤感受性試験では，キノロン系薬剤，特に ERFX，NFLX が極めて高い感受性を示し，次に CL および GM が高感受性であった（表 2）。PCG，SDMX，EM，TC および OTC については半数以上の株が耐性を示した。

３．豚由来病原性大腸菌の薬剤感受性と毒素産生性

（1）材料と方法

ア．試験①

九州の養豚場 3 戸において，1997 ～ 2003 年に

表 1　2001 年 7 月～ 2005 年 3 月に分離された子牛由来大腸菌の血清型と病原遺伝子の保有状況

血清型	病原遺伝子						
	stx1	*stx2*	*stx1+2*	*stx1+eaeA*	*stx2+eaeA*	*stx1+2+eaeA*	*eaeA*
O8:HNT				1			
O11:HNT	1						
O15:H45	1						
O26:H11				14			
O26:H27				1			
O26:H41							1
O26:HNT	3			3			1
O26:HNM	9			11			
O29:H20					1		
O63:HNM	1						
O111:HNM	4		2	4			
O119:H16		1					
O119:H28				1			
O127:HNM							1
O136:HNT	1						
O157:H7					2		
O157:HNT					2	1	
O168:H16				1			
O168:NNM				1			
O169:H21							1
その他	31	4	2	15	4	0	34
合計	51	5	4	52	9	1	38

表 2　2001 年 7 月～ 2005 年 3 月に分離された子牛由来大腸菌 160 株の薬剤感受性

	MIC(mg/L)													
	≦ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	›512
ABPC				4	15	76	11		2			3	25	24
PCG							7	36	51	13	1	6	23	23
AMPC			1	14	15	73	1			2	1		2	51
GM	16	101	36				1			4		2		
KM			8	68	44		2		1	8			10	19
EM								1	10	120	22	2	3	2
CL	30	117	8		2					1				2
TC				6	61	4		4	1	12	61	10	1	
OTC				35	30	4			2	2	13	59	14	1
CP					1	119	9	2	13	2	3	10	1	
BCM								22	110	11	10	5		12
FOM			1	1	8	15	44	35	20	19	16			1
SDMT									4	16	27	11	2	100
OXA	125	11		1		14	6	2		1				
NA				11	104	21	1	1		12	5	3		2
ERFX	140	9	9			1		1						
NFLX	127	8	21	2	1			1						

30 ～ 80 日齢の子豚が合計約 10,000 頭死亡する大腸菌性腸管毒血症が集団発生した［17, 21］。集団死亡事故の発生期間は 14 ～ 19 ヵ月におよび，月間の子豚死亡率が 43％に達する月もあった。上記の発生期間のうち，1997 ～ 2001 年に発生した死亡豚の腸管内容物あるいは発症豚の糞便から分離された豚由来腸管毒血症性大腸菌（ETEEC）57 株について，好気および嫌気条件下で薬剤感受性試験を実施した。薬剤としては ABPC，PCG，AMPC，CAZ，GM，KM，SM，CL，PL，EM，CP，FOM，SDMX，SMX，TMP，OL，LCM，TC，CTC，NB，BCM，IPM，OXA，NA，NFLX，ERFX，OBFX および DFLX を供試した。

イ．試験②

2001 年 11 月より離乳後子豚の下痢による死亡が急増し，2003 年 6 月に至るまで月間 40 ～ 100 頭の死亡事故が持続していた母豚 400 頭，一貫経営 A 養豚場の離乳子豚の下痢について病原学的検索を実施した。発症は離乳後 7 日前後から発生し，急性の経過では 1 ～ 3 日で死亡するものもあった。農場では KM，PCG，ABPC，CL，FM，DOXY，CTF などの抗菌剤，生菌・有機酸製剤，オリゴ糖，ミネラル製剤などの投与が行なわれていた。また，その後，2003 年 5 月～ 2004 年 2 月までの間に分離された ETEEC 株についても性状を検査した。

ウ．試験③

前述 A 農場由来多剤耐性 3 株（2002 年 6 月～ 2003 年 1 月），薬剤感受性 3 株（2004 年 1 月～ 2004 年 2 月），ETEEC 基準株 ATCC23546，非病原性大腸菌基準株 ATCC25922 および当該農場由来非病原性野外株 MVH1369-7 の合計 9 株を用いて生存性について比較・検討を行った。生存性比較試験はペーパーディスク法［7］で実施した。

エ．試験④

北海道，長崎県，大分県および宮崎県の大腸菌性腸管毒血症が発生した 9 農場の発症子豚（28 ～ 115 日齢）から分離された ETEEC 株について Stx 産生能を比較検査した。

オ．試験⑤

大腸菌性腸管毒血症罹患豚由来 ETEEC 2 株（MVH 269 および MVH 886）について菌増殖性および産生毒素量との関係を経時的に測定した。

カ．試験⑥

薬剤添加培地における ETEEC の増殖性および毒素抑制試験を実施した。生菌数を 10^8cfu/ml に調整し，各薬剤の最終濃度× 16MIC 濃度，× 1MIC 濃度，× 1/16MIC 濃度に調整し，37℃，4 時間静置培養した。毒素量は培養上清を 0.22 μm のメンブランフィルターを用いてろ過し，Vero 細胞傷害性を測定した［5］。

(2) 結果および考察

ア．試験①

アミノグリコシド系薬剤，ペプチド系薬剤および BCM は比較的高い効力を保持していたが，β - ラクタム系薬剤，マクロライド系薬剤，テトラサイクリン系薬剤，サルファ剤，ST 合剤および一部のキノロン系薬剤に対して感受性の低い株が 80％以上認められた（表 3-1, 3-2）。さらに，培養条件による抗菌剤の感受性の差が認められ，GM，KM および NFLX は好気条件下で，CL，CTC，CP，NB，FOM および DFLX は嫌気条件下でそれぞれ感受性が高かった。

イ．試験②

2002 年 6 月～ 2003 年 1 月の間，20 検体中 14 検体から 18 株の ETEEC が主要な病原因子として分離された。分離 18 菌株は，血清型，保有する病原性遺伝子および薬剤感受性について多様な性状を示した。分離された 18 菌株には多剤耐性株が存在し（表 4-1），抗菌剤による疾病対策の困難が示唆され，農場の衛生管理，環境管理の徹底と共に，抗菌剤に依存しない大腸菌対策が必要と考えられ，実行された。その後，2002 年から CL など 1 年間以上，ほとんど抗菌剤を使用しなかった当該農場において，2003 年 6 月までは多剤耐性株が検出されたが，2004 年 1 月および 2004 年 2 月の調査では，多くの薬剤に対して感受性を示す ETEEC が有意に検出された（表 4-2）。

ウ．試験③

すべての温度条件で，ETEEC 基準株 ATCC23546 が実験開始から 1 ～ 2 週間で最も早く死滅した。一方，分離された多剤耐性株と薬剤感受性株の間

表 3-1　1997 ～ 2001 年に分離された子豚由来大腸菌の薬剤感受性

薬剤名		好気条件				嫌気条件			
		MIC の範囲	MIC_{50}	MIC_{90}	MIC_R [a]	MIC の範囲	MIC_{50}	MIC_{90}	MIC_R
β-ラクタム系薬剤	Ampicillin	3.13 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	1.56	0.78 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	0.78
	Benzylpenicillin	12.5 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	12.5	6.25 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	12.5
	Amoxicillin	3.13 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	3.13	1.56 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	1.56
	Ceftazidime	12.5 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	12.5	25.0 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	50
	Imipenem	＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100
アミノグリコシド系薬剤	Gentamicin	≦ 0.05 － 25.0	0.2	25	0.1	0.20 － 50.0	1.56	50	0.78
	Kanamycin	0.78 －＞ 100	6.25	＞ 100	1.56	3.13 －＞ 100	12.5	＞ 100	6.25
	Streptomycin	0.78 －＞ 100	25	＞ 100	1.56	0.78 －＞ 100	25	100	1.56
マクロライド系薬剤	Erythromycin	3.13 －＞ 100	50	100	50	50.0 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	100
	Oleandomycin	6.25 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100	50 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100
	Lincomycin	25.0 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100	25.0 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100
ペプチド系薬剤	Colistin	≦ 0.05 － 50.0	0.39	25	0.2	0.20 － 50.0	0.39	12.5	0.2
	Polymyxin-B	≦ 0.05 －＞ 100	1.56	12.5	12.5	0.39 －＞ 100	1.56	25	1.56
テトラサイクリン系薬剤	Tetracycline	6.25 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	3.13	0.78 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	0.78
	Chlortetracycline	50.0 －＞ 100	100	100	6.25	0.78 － 100	50	100	1.56
その他	Chloramphenicol	0.78 －＞ 100	12.5	＞ 100	1.56	0.78 －＞ 100	6.25	＞ 100	1.56
	Novobiocin	3.13 －＞ 100	100	100	12.5	1.56 －＞ 100	12.5	50	12.5
	Bicozamycin	12.5 －＞ 100	25	50	25	12.5 －＞ 100	25	100	50
	Fosfomycin	25.0 －＞ 100	100	＞ 100	＞ 100	12.5 － 100	25	50	50
サルファ剤	Sulfadimethoxine	12.5 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	50	12.5 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	25
	Sulfamethoxazole	＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100	＞ 100
	Trimethoprim	≦ 0.05 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	0.2	0.1 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	0.39
キノロン系薬剤	Oxolinic acid	0.20 －＞ 100	50	＞ 100	0.2	≦ 0.05 －＞ 100	100	＞ 100	≦ 0.05
	Nalidixic acid	0.78 －＞ 100	＞ 100	＞ 100	0.78	3.13 －＞ 100	50	＞ 100	12.5
	Enrofloxacin	≦ 0.05 － 6.25	3.13	6.25	≦ 0.05	≦ 0.05 － 12.5	3.13	6.25	≦ 0.05
	Orbifloxacin	≦ 0.05 － 12.5	12.5	12.5	≦ 0.05	≦ 0.05 － 12.5	12.5	12.5	≦ 0.05
	Difloxacin	≦ 0.05 － 50.0	25	25	≦ 0.05	≦ 0.05 － 50.0	12.5	25	≦ 0.05
	Norfloxacin	≦ 0.05 － 12.5	3.13	12.5	0.78	0.20 － 50.0	25	25	0.2

[a] MIC_R: *E.coli* ATCC 23546 の MIC 値 (mg/L)　　Uemura R, Sueyoshi M, Nagayoshi M, et al.［18］から引用一部和訳

に明らかな生存期間の違いは認められなかったが，5℃温度条件環境で，感受性の MVH1880 株がやや長い生存性を示した（図 1）。A 養豚場の発症子豚由来 ETEEC が多剤耐性株から感受性株に推移したことについて，CL などの抗菌剤を使用しない環境で多剤耐性株の生存性が弱いことも一因と示唆された。5℃，15℃および 25℃の温度条件では 25℃において最も早く菌が死滅した。

エ．試験④

毒素産生量は，宮崎 A 農場および長崎 A 農場由来の各 1 株が基準株の ATCC23546 株と同様低産生量であったが，その他の株は ATCC23546 株以上の毒素産生が認められ，特に，宮崎 C 農場では O139 の 12 株で 9,129.0 ± 4,504.3（CD_{50}），ONT の 5 株で 9,609.0 ± 6,213.9（CD_{50}）の産生量が認められ，宮崎 D の O141 の 9 株では 1,227.9

表 3-2　1997 ～ 2001 年に分離された子豚由来大腸菌の薬剤感受性

薬剤名		MIC：mg/L													
		≦ 0.05	0.10	0.20	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25.0	50.0	100	>100	Total
β - ラクタム系薬剤	Ampicillin					0/1[a]	0/5	6/2	2/0	0/1		1/0		48/48	57/57
	Benzylpenicillin								0/1	1/1	6/6	1/0		49/49	57/57
	Amoxicillin						0/7	8/1				0/1	1/1	48/47	57/57
	Ceftazidime									1/0	6/2	14/8	5/10	31/37	57/57
	Imipenem													57/57	57/57
アミノグリコシド系薬剤	Gentamicin	5/0	18/0	6/1	0/7	1/16	0/5	1/1	0/1	20/1	6/9	0/16			57/57
	Kanamycin					3/0	11/0	4/1	19/15	2/24	1/3	3/1	3/0	11/13	57/57
	Streptomycin					1/1	2/2	2/2	2/2	17/17	13/13	7/7	7/7	6/6	57/57
マクロライド系薬剤	Erythromycin							1/0		2/0	1/0	26/1	26/17	1/39	57/57
	Oleandomycin								1/0			1/1	2/0	53/56	57/57
	Lincomycin										2/1	4/0		51/56	57/57
ペプチド系薬剤	Colistin	2/0		15/23	22/12	5/1	0/2	1/3	3/5	2/9	6/1	1/1			57/57
	Polymyxin-B	1/0			0/1	5/13	35/20	5/7	1/0	8/7	0/7			2/2	57/57
テトラサイクリン系薬剤	Tetracycline					0/1			1/0			0/2	0/5	56/49	57/57
	Chlortetracycline					0/1			0/1		0/3	5/38	0/14	52/0	57/57
その他	Chloramphenicol					1/1	4/17	19/5	4/6	2/2	3/5	5/4	1/1	18/16	57/57
	Novobiocin						0/3	1/1	1/0	0/26	5/18	13/5	31/2	6/2	57/57
	Bicozamycin									5/20	39/30	8/1	0/1	5/5	57/57
	Fosfomycin									0/10	6/35	26/10	0/2	25/0	57/57
サルファ剤	Sulfadimethoxine									1/2	2/0	1/2	0/2	53/51	57/57
	Sulfamethoxazole													57/57	57/57
	Trimethoprim	1/0	0/1		2/1	2/4	3/0	5/5	7/9	1/0	0/1			36/36	57/57
キノロン系薬剤	Oxolinic acid			2/3	3/3	3/3	8/8	5/5	1/0	3/2	1/4	3/0	1/15	27/14	57/57
	Nalidixic acid					2/0	5/0	2/2	7/1	3/3	2/16	1/10	3/5	32/20	57/57
	Enrofloxacin	8/6	11/12	1/2	3/1	3/5	2/2	16/9	13/19	0/1					57/57
	Orbifloxacin	1/1	8/5	5/4	6/5	2/6	1/0	0/1	1/0	33/35					57/57
	Difloxacin	20/20		1/2	1/1	1/2	1/1	1/0	1/2	1/19	25/9	5/1			57/57
	Norfloxacin	2/0	4/0	5/3	7/5	7/8	3/6	1/1	1/5	27/2	0/26	0/1			57/57

[a] 好気条件 / 嫌気条件　　Uemura R, Sueyoshi M, Nagayoshi M, et al.［18］から引用一部和訳

± 236.4（CD_{50}）の産生量が認められた（図 2）。上記 2 農場から大量に志賀毒素を産生する強毒株が 25 株検出された。分離菌の毒素産生能と血清型あるいは浮腫病が長期持続した農場間に関連は認められなかった。

オ．試験⑤

ETEEC の増殖曲線は，培養 6 時間後には定常期に達し，全株が同様の増殖曲線を示した（図 3）。放出毒素は，菌増殖が定常期に達した後（培養 6 ～ 8 時間後）に検出され始め，20 ～ 48 時間後に最高値を示した。菌体内毒素は，培養 6 時間後に検出され始め，12 ～ 36 時間後に最高値を示した。供試株は全て菌体内毒素量が放出量よりも多かった。ETEEC の産生毒素は，ヒト由来 STEC O157:H7 の産生する志賀毒素 1 と同様に蓄積型であり，菌の対数増殖期末期から毒素産生･放出量

表 4-1　2002 年 6 月～ 2003 年 1 月に A 養豚場において分離された ETEEC の薬剤感受性

採材時期	2002.6.			2002.8.										2003.1.				
菌株名 / 薬剤名	1331	1313	1314	1360	1361-1	1361-2	1361-3	1362-1	1362-2	1362-3	1363	1368	1370	1504	1505	1506	1507	1508
PC-G	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ABPC	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
AMPC	−	−	−	−	−	−	−	+++	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
CEZ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	++	++
CXM	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++
CAZ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CFIX	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SM	++	−	++	++	++	+	−	++	+	++	−	+	−	+	+	+	+	+
FRM	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+++	−	−	−	+
KM	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+++	−	−	−	+
GM	−	−	−	−	−	−	+++	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
TC	−	−	−	−	−	−	+++	−	−	−	−	−	++	−	−	−	−	−
OTC	−	−	−	−	−	−	+++	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
DOXY	++	++	++	++	++	−	+++	++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	++
CP	+++	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	−	+++	−	−	+++	−	+++	+
CL	−	−	−	−	−	−	+++	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
PL	−	+	+	+	+	++	+++	+	+	+	++	+	+	−	−	+	−	+
FOM	+++	−	−	−	−	−	+++	−	++	++	++	−	+	+	++	++	++	++
NB	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+
ST	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
BCM	−	−	−	−	−	−	++	−	−	−	++	+	++	−	++	−	++	−
FF	+++	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	+	−	+++	−	+++	−
NA	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
NFLX	+	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+++	+	+	+	+	+	+	+
OFLX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+++	+	+	+	+	+	+	+

−：耐性，＋：感性，＋＋：感性（中等度），＋＋＋：感性（高度）（ディスク法）

表 4-2　2003 年 5 月～ 2004 年 2 月に A 養豚場において分離された ETEEC の薬剤感受性

採材時期	2003.5.	2003.6.		2004.1.	2004.2								
菌株名 / 薬剤名	1514	1557	1558	1851	1870-1	1870-2	1871-3	1872-1	1872-2	1872-3	1872-6	1873	1880
PC-G	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ABPC	−	−	−	+++	−	−	−	−	−	−	−	−	−
AMPC	−	−	−	+++	−	−	−	−	−	−	−	−	−
CEZ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CXM	++	+++	++	+++	++	++	+++	+++	++	+++	++	++	+++
CAZ	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CFIX	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
SM	+	−	−	++	−	+++	+++	+++	+	+++	+	+	+++
FRM	−	−	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
KM	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
GM	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	−	+++	−	−	+++
TC	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	−	+++	−	−	+++
OTC	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	−	+++	−	−	+++
DOXY	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	++	+++
CP	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
CL	−	+++	+++	+++	+++	+	++	+	+	+	+	+	++
PL	−	−	−	+++	+++	++	++	+++	++	+++	++	++	+
FOM	+++	+	+	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	++	+++
NB	+	+++	++	++	+	−	+	+	+	+	+	+	++
ST	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	−	+++	−	−	+++
BCM	+	−	−	++	+	+	+	+	++	+	++	++	+++
FF	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+++	++	+++	+++	+++
NA	−	+	−	+++	+	+++	+++	+++	−	+++	−	−	−
NFLX	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+	+++
OFLX	−	−	−	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+	+	+++

−：耐性，＋：感性，＋＋：感性（中等度），＋＋＋：感性（高度）（ディスク法）

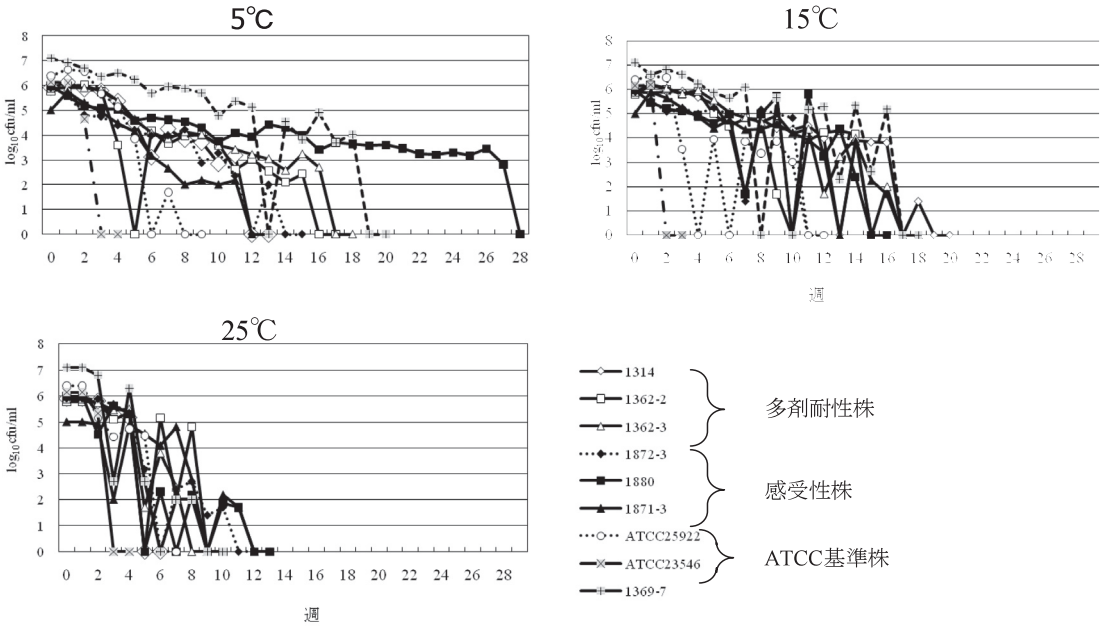

図１　ETEEC 多剤耐性株と感受性株の温度環境での生存性

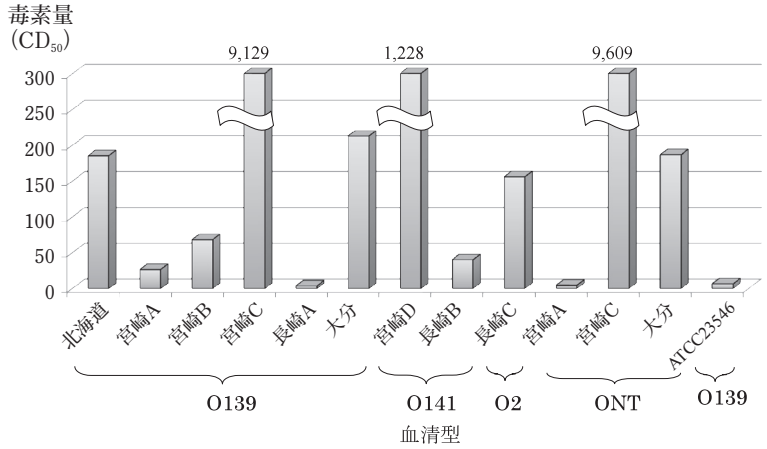

図２　農場由来 ETEEC 株間の Stx 放出量の相違
由地裕之，末吉益雄，永友寛司ら［21］を引用グラフ化

が増加した。

カ．試験⑥

薬剤添加培地における ETEEC の増殖性および上清中 Stx 量試験結果（図 4）から，ABPC，CL，PL-B，OTC，ERFX，OBFX，NFLX は対照と比較して，× 1MIC 濃度で CD_{50} 値が低く，上清中への Stx 放出抑制が認められた。× 16MIC 濃度で CD_{50} 値が低く，上清中への Stx 放出抑制が認められた薬剤は前述の薬剤に加え，GM，KM，BCM，OXA，NA，DFLX であった。また，CL，PL-B，BCM，FOM，OXA，NA，ERFX，DFX，NFLX は対照と比較して，× 1MIC 濃度で菌増殖抑制が認められた。× 16MIC 濃度で菌の増殖抑制が認められた薬剤は前述の薬剤に加え，

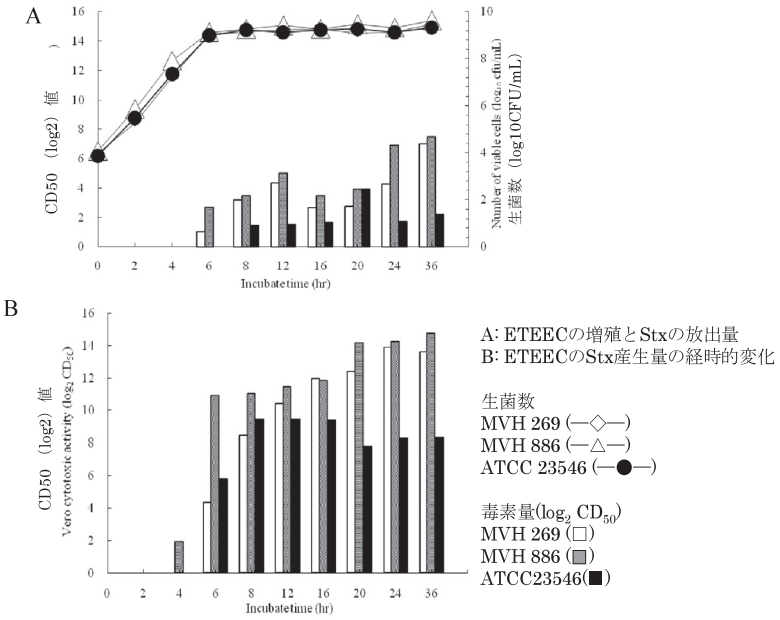

図 3　ETEEC 増殖と Stx 毒素産生量

Uemura R., Sueyoshi M., Taura Y. et al.［19］から引用

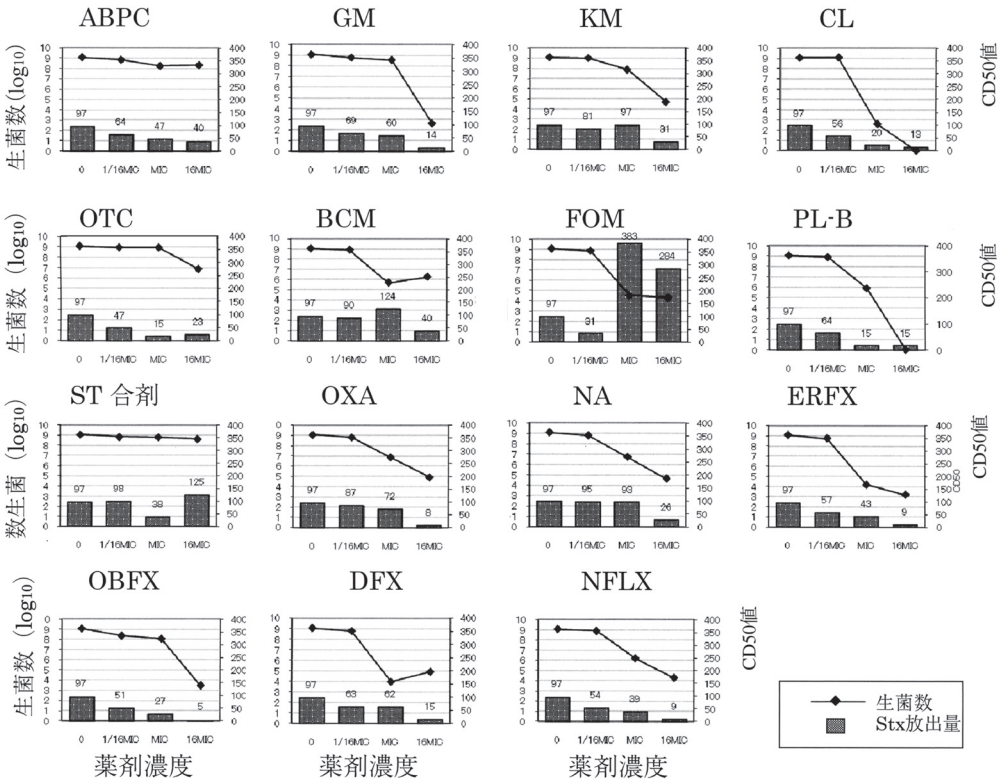

図 4　抗菌剤添加時の ETEEC の増殖性と Stx 毒素放出量

末吉益雄［15］から引用

GM，KM，OBFX であった。FOM では対照と比較して，CD_{50} 値の著明な増加を認め，培養上清中への Stx 放出促進が認められた。

4．まとめ

2001 年 7 月～ 2005 年 3 月の間，下痢発症子牛の糞便あるいは腸管内容物由来 STEC 株について性状を検査した結果，血清型は O26 が多く，*stx1* 遺伝子保有株が多かった。薬剤感受性試験では，キノロン系薬剤，特に ERFX および NFLX が極めて高い感受性を示し，次に CL および GM が高感受性であった。

1997 ～ 2001 年の間，大腸菌性腸管毒血症発症子豚由来 ETEEC 株について薬剤感受性試験を実施したところ，ペプチド系薬剤および BCM は比較的高い感受性を保持していた。また，9 農場中 2 農場から強毒株が 25 株検出された。多剤耐性 ETEEC 株が分離された農場において，抗菌剤に依存しない対策をとったところ多くの薬剤に対して感受性を示す ETEEC 株が有意に検出された。ETEEC は人由来 STEC-O157:H7 と同様，毒素蓄積型であり，薬剤の種類あるいは濃度によって毒素放出量が異なっていた。

引用文献

1）Antimicrobial susceptibility methods: National Committee for Clinical Laboratory Standards. USA (2002)

2）Bertschinger HU, Gyle CL: Oedema disease of pigs. *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, Gyles CL, ed, 193-219, Cab International Co., Wallingford, UK (1994)

3）Fairbrothe JM, Gyles CL: Postweaning *Escherichia coli* diarrhea and edema disease. Diseases of Swine, Straw BE, et al eds, 9th ed, 649-662, Blackwell Publ, Iowa (2006)

4）Iijima T, Sueyoshi M, Yamamoto T, Yoshida K, Nakazawa M: Diarrhea due to “Attaching and effacing *Escherichia coli* (O26)” infection in a calf. Jpn J Vet Sci, 52, 1347-1350 (1990)

5）伊藤輝代，秋野恵美，平松啓一：腸管出血性大腸菌 O157 に用いる抗生物質の検討．感染症学雑誌，71，130-135（1997）

6）黒木昭浩，山本慎一郎，末吉益雄，大田　洋，恒吉雅治，松田治子，中澤宗生：子牛の腸管接着性微絨毛消滅性大腸菌および *Enterobacter cloacae* の混合感染症の一例．日獣会誌, 49, 9-12（1996）

7）Nagatomo H, Takegahara Y, Sonoda T, Yamaguchi A, Uemura R, Hagiwara S, Sueyoshi M: Comparative studies of the persistence of animal mycoplasmas under different environmental conditions. Vet Microbiol, 82, 223-232 (2001)

8）中澤宗生：豚の浮腫病とは，動物用抗菌剤研究会報，21，25-29（2000）

9）中澤宗生，末吉益雄：ブタの浮腫病，臨床と微生物，23，843-849（1996）

10）中澤宗生 . 大腸菌病，豚病学，柏崎　守 他編，第 4 版，328-337，近代出版，東京（2000）

11）中澤宗生，鮫島俊哉，秋庭正人，末吉益雄：志賀毒素産生性大腸菌の家畜大腸菌症における分布と下痢原性．獣医畜産新報, 50, 655-658（1997）

12）末吉益雄，中澤宗生，大宅辰夫，伊藤博哉，田中省吾，佐藤邦彦：ベロ毒素産生性大腸菌（VTEC）の動物感染モデルの作出および牛における VTEC・O157:H7 実験感染試験．農林水産省家畜衛生試験場研究報告，104，29-31（1998）

13）Sueyoshi M, Nakazawa M: Experimental infection of young chicks with attaching and effacing *Escherichia coli*. Infect Immun, 62, 4066-4071 (1994)

14）Sueyoshi M, Fukui H, Tanaka S, Nakazawa M, Ito K: A new adherent form of an attaching and effacing *Escherichia coli* (*eaeA*+, *bfp*–)to the intestinal epithelial cells of chicks. J Vet Med Sci, 58, 1145-1147 (1996)

15）末吉益雄：動物における VTEC の疫学，病態，防除対策．日本小児腎不全学会雑誌，24，60-62（2004）

16）Sueyoshi M: Enterotoxaemia by *Escherichia coli* of piglets. Proc Jpn Pig Vet Soc, 48, 7-13 (2005)

17）上村涼子，末吉益雄，田浦保穂，永友寛司：大腸菌性腸管毒血症による子豚の集団死亡事故の長期持続事例．日獣会誌，57，231-234（2004）

18) Uemura R, Sueyoshi M, Nagayoshi M, Nagatomo H: Antimicrobial susceptibilities of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from pigs with edema disease in Japan. Microbiol Immnol, 47: 57-61 (2003)
19) Uemura R, Sueyoshi M, Taura Y, Nagatomo H: Effect of antimicrobial agents on the production and release of shiga toxin by enterotoxaemia *Escherichia coli* isolates from pigs. J Vet Med Sci, 66, 899-903 (2004)
20) 由地裕之，末吉益雄，永友寛司，田浦保穂：浮腫病発生農場由来腸管毒血症性大腸菌株の毒素産生能の比較調査．日獣会誌，61，530-532（2008）
21) 由地裕之，末吉益雄，永友寛司，田浦保穂：1 養豚場における大腸菌性腸管毒血症の大規模再発事例．日獣会誌，62，211-214（2009）

Antimicrobial Susceptibility and Toxin Production of Shiga-toxin Producing *Escherichia coli* Isolated from Calves and Piglets

Masuo SUEYOSHI, Ryoko UEMURA and Hiroshi NAGATOMO

Department of Veterinary Hygiene, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1 Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki, 889-2192

The O serogroup 26 and *stx1* gene positive strains were major, on the result of examination of shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from the feces or the intestinal content of calves with diarrhea between 2001 and 2005. Those STEC strains showed extremely high sensitivity against ERFX and NFLX, and were highly sensitive secondly against CL and GM, in the antimicrobial susceptibility examination. On the other hand, the enterotoxemic *Escherichia coil* (ETEEC) isolated from piglets with *E. coli*-related enterotoxaemia showed high susceptibility to peptides and BCM as well as the reference strain. In addition, twenty five virulent strains were detected from 2 farms. On the other farm where multiple drug resistant ETEECs were detected, the drug susceptible strains were mainly detected about one year after treatment without the antimicrobial administrations. These ETEECs were toxin accumulation type same as human origin STEC-O157: H7 strain, and the Stx-release dose was different by a drug variety or concentration.

討　論（座長：澤田拓士　日獣大）

質問（松本修治，大日本住友製薬）

浮腫病に対する発表をお聞きし，*in vitro* の成績では CL とか FQ がいいように思ったのですが，現場では投与するタイミングとかが難しいと思います。野外で効果がみられている抗菌薬と，抗菌薬以外でいい治療法がありましたら教えていただきたい。

答（末吉益雄）

CL が効かなくなったという話も聞きますが，ERF がよく効いています。抗菌薬以外では炭酸亜鉛の臨床効果がみられています。鶏卵蛋白も臨床効果があると聞いています。

質問（片岡　康，日獣大）

FOM，ST などを投薬すると放出毒素量が増えて症状が出るが，CL の場合は放出毒素量が少ないということですが，FOM は細胞壁合成阻害作用，CL は細胞膜障害作用だと思います。菌に対する抗菌薬の作用点の違いにより放出毒素に差があるならば，どの作用点が一番出てくるのでしょうか。

答（末吉益雄）

厚労省では O157 の治療に FOM の使用を決めているが，条件があり，早期発見，早期治療が基本となります。CL とか GM，KM あたりを薦めている。

質問（片岡　康，日獣大）

発症から3日目くらいまでは殺菌性の薬を使ってもよいということになっていますが，4日目以降は放出毒素が怖いので静菌性の薬を使うようにとなっていますが，先生の考えでは浮腫病が発生した場合にどのくらいで殺菌性の薬から静菌性の薬へと切り替えていけばよいのでしょうか。

答（末吉益雄）

サルモネラでは全身感染の可能性がある場合は筋注で，保菌している場合は飲水投薬するとかの方法があるのですが，浮腫病を発症している状況では菌数がかなり増えているので静菌性の抗菌薬を投与するとか，あまり増えていない状況で殺菌的な抗菌薬をというふうにやって，そのリバウンドを経験しているので怖い。将来的には，殺菌的な抗菌薬を投薬してもGB4と競合するような吸着剤を投与できればと思う。人で利用できても，高価であり家畜に応用するにはなかなか難しい。

質問（藤倉孝夫，動衛研OB）

中国中南部の安徴省の農村では子牛の肥育，養豚，養鶏，養鹿が盛んであるが，コクシジウム感染による下痢症により，大きな被害を受けている。サルファ剤の大量長期間の投与により効果があるとされているが，より経済的に，省力的に有効な薬剤が開発されていれば教えていただきたいです。

答（末吉益雄）

サルファ剤はいつまでも有効なところと効きが無くなっているところがあり，静菌剤ではサルトーゼという鶏のコクシジウムのものがあるが，どうなのか。最近ではバイコックスという抗コクシジウム剤が発売され，まだそれはフィールドでどのくらいの効果があるのか聞いていません。欧米の方では効果があると期待されていたのですが。日本では3ヵ月齢以上しかモルニシンを使用していない。アメリカではモルニシンも承認されていますので，日本とは状況が違うかもしれません。中国の承認の問題は分かりませんが，環境に強いコクシジウムですから，新しいものを応用するのは難しいと思います。