動物に対するキノロン系抗菌剤の使用と耐性菌選択との関連

秋庭正人

動物衛生研究所安全性研究チーム（〒 305-0856 茨城県つくば市観音台 3-1-5）

1. はじめに

動物と人の両方の健康を保護する観点から、動物用抗菌性物質の「慎重かつ責任ある使用」が求められている。農林水産省の諮問を受けて、食品安全委員会は代表的な抗菌性物質の系統別重要度を、薬剤耐性菌が出現した場合の代替薬の有無という観点から評価した。フルオロキノロン (FQ) および第3, 4世代セフェム系薬剤は、人の特定な疾病に対する唯一の薬であり代替薬がほとんどないため、極めて高度に重要なランク I に分類されている。

我々は動物に対して抗菌剤を使用することが、どの程度耐性菌を選択するかとの命題に対する科学的評価を行うことを目的として調査研究を行ったところ、キノロン系抗菌剤の使用と耐性菌選択との関連において若干の知見を得た [1] ので、その成績を紹介する。

2. 牛由来 *Salmonella* Dublin の薬剤感受性の変化

(1) 目的

Salmonella enterica serovar Dublin (SD) は牛サルモネラ症の主要原因菌の一つであり、発症牛にはほとんどの場合、抗菌剤治療が施される。本菌は牛に特異的であり、本菌の薬剤感受性は人における抗菌剤使用の影響を受けないと考えられる。そこで我々は長期間にわたって日本全国から収集した牛由来 SD の薬剤感受性を調べ、野外における薬剤使用状況に関する情報と合わせるこ

で、食用動物における抗菌剤使用が薬剤耐性菌選択に及ぼす影響について評価することを試みた。

(2) 材料と方法

ア. 供試菌株

1976年から2005年の30年間に国内の牛から分離したSD 168株を用いた。これらの菌株に疫学的関連は認められない。

イ. 薬剤感受性試験

NCCLSガイドラインに準拠した寒天平板希釈法により最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。供試抗菌剤としてナリジクス酸 (NA), エンロフロキサシン (ERFX), シプロフロキサシン (CPFX), オフロキサシン (OFLX) を選択した。

ウ. キノロン系薬剤耐性化機構の解析

トポイソメラーゼ遺伝子 (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*) の Quinolone Resistance Determining Region (QRDR) をPCR増幅し、その塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した。これによりNA耐性を引き起こしたトポイソメラーゼのアミノ酸置換部位を特定した。さらに、温度感受性ベクターを用いた遺伝子交換法により、*gyrA* 復帰変異株またはサルモネラの主要な多剤排出ポンプを規定する遺伝子 *acrRAB* の欠失変異株を作出し、親株との間でキノロン系薬剤に対するMICを比較した。

(3) 結果

ア. キノロン系抗菌剤に対する感受性の変化

表1にキノロン系抗菌剤に対するMICの推移を示した。1980年代前半までの株にNA耐性菌は認められなかったが、1980年代後半には典型

表1 S. Dublinのキノロン系抗菌剤に対する感受性の推移

期間	株数	MIC (mg/L) ^a							
		NA		ERFX		OFLX		CPFX	
		値幅	MIC ₉₀	値幅	MIC ₉₀	値幅	MIC ₉₀	値幅	MIC ₉₀
1976-1980	7	2-4	4	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125
1981-1985	8	2-4	4	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125	<0.125
1986-1990	39	2->512	512	<0.125-1	0.5	<0.125-1	0.5	<0.125-0.25	0.25
1991-1995	68	128->512	512	<0.125-1	0.5	0.25-2	1	<0.125-1	0.25
1996-2000	33	4->512	512	<0.125-1	1	<0.125-2	2	<0.125-1	0.5
2001-2005	13	256-512	512	0.25-0.5	0.5	0.5-1	1	0.25-0.5	0.25

^a ナリジクス酸, ERFX; エンロフロキサシン, OFLX; オフロキサシン, CPFX; シプロフロキサシン

的な2峰性分布を示し、1990年代前半以降の株は、ほとんどがNA耐性を示した。一方、FQ系抗菌剤であるERFX, OFLX, およびCPFXに対して明らかに耐性を示す株は認められなかったが、感受性の低下した株は散見された。

イ. キノロン系抗菌剤に対する感受性とトポイソメラーゼ変異

NA感受性の5株と耐性の9株を選び、トポイソメラーゼ遺伝子のQRDRの塩基配列からアミノ酸置換部位の特定を試みたところ、NA耐性

株では *gyrA* 遺伝子の87番目のアスパラギン酸(Asp)がチロシン(Tyr)に変異していることが明らかとなった。本研究では単一の変異しか認められないにもかかわらず、FQに対するMICは最大で4倍異なっており(表2)、トポイソメラーゼ変異以外の耐性化機構の関与が示唆された。

ウ. *gyrA* 復帰変異と *acrRAB* 欠失変異がキノロン系抗菌剤に対する感受性に及ぼす影響

AcrAB-TolC システムはサルモネラの主要な多剤排出ポンプである。SDのFQ低感受性に対す

表2 キノロン系抗菌剤に対するS. Dublinの感受性とトポイソメラーゼ変異

菌株番号	分離年	MIC (mg/L) ^a				トポイソメラーゼ変異
		NA	ERFX	OFLX	CPFX	
974	1985	2	<0.125	<0.125	<0.125	NDb
489	1981	4	<0.125	<0.125	<0.125	ND
729	1983	4	<0.125	<0.125	<0.125	ND
2876	1998	4	<0.125	0.125	<0.125	ND
2402	1996	4	<0.125	0.25	<0.125	ND
1886	1992	256	0.5	0.5	0.25	GyrA (Asp87Tyr)
1177	1988	512	0.25	0.5	0.25	GyrA (Asp87Tyr)
1242	1989	512	0.5	0.5	0.25	GyrA (Asp87Tyr)
1506	1990	512	0.5	0.5	0.25	GyrA (Asp87Tyr)
3486	2004	512	0.5	1	0.25	GyrA (Asp87Tyr)
1563	1990	512	1	1	0.25	GyrA (Asp87Tyr)
2185	1995	512	1	1	1	GyrA (Asp87Tyr)
3468	1998	512	1	2	0.5	GyrA (Asp87Tyr)
2226	1994	>512	1	2	0.5	GyrA (Asp87Tyr)

^a NA; ナリジクス酸, ERFX; エンロフロキサシン, OFLX; オフロキサシン, CPFX; シプロフロキサシン

^b 検出できず

本システムの関与を検証する目的で、表2に含まれる6株を用いて *acrRAB* 遺伝子欠失変異株および *gyrA* 復帰変異株を作出し、親株との間でキノロン系薬剤に対するMICを比較した。表3に示したように、NAでは *gyrA* 復帰変異株の方が *acrRAB* 遺伝子欠失変異株よりもMICの減少幅が大きかった。一方、FQでは *acrRAB* 遺伝子欠失変異株の方が *gyrA* 復帰変異株よりもMICの減少幅が大きく、親株のMICが大きい株ほど *acrRAB* 遺伝子欠失変異によるMICの減少幅が大きい傾向が示された。

(4) 考察

わが国において動物用医薬品としてのNAは1980年代半ばに導入された。1980年代後半にはNA耐性SDが出現し、現在ではほとんどの野外分離株がNA耐性を示す。NA耐性菌には単一の *gyrA* 変異 (Asp87 → Tyr) が認められた。これらの株ではFQに対する感受性が低下しており、FQに対するMICは最大で4倍異なっていたが、ERFXが導入された1990年代前半以降もFQ耐性菌は認められなかった。*gyrA* 復帰変異株と *acrAB* 欠失変異株を用いた解析の結果から、*gyrA* 変異株はNAの使用により選択されたもので、AcrAB-ToICシステムはFQに対する感受性の低下に寄与している可能性が示唆された。これらの成績は、獣医領域におけるNA導入が日本の牛群におけるSDの薬剤感受性に影響したが、ERFX

の導入は影響を及ぼさなかったことを示唆している。

3. 伴侶動物から分離された大腸菌のFQ感受性

(1) 目的

動物病院では伴侶動物の治療にFQ系抗菌剤が使用されているが、その使用実態や薬剤耐性菌の出現状況は十分明らかにされていない。そこで本研究では伴侶動物から大腸菌を分離し、FQ系抗菌剤に対する感受性を調べた。

(2) 材料と方法

2005年4月から2007年3月までに某大学付属動物医療センターにて二次診療を受診し、細菌感染症と診断された910症例の伴侶動物から59株の大腸菌を分離した。メーカーより供給を受けた感受性ディスクを用い、寒天平板拡散法により、これら菌株のERFXに対する感受性を調べた。

(3) 結果と考察

供試した59株中、32株(54.2%)がERFX耐性であった。患畜は一般病院での治療後に医療センターに来院したものである。一般病院での治療歴は明らかでない。同センターにおいてFQ系抗菌剤は使用されておらず、一般病院における治療から採材、菌分離までの間隔は1ヶ月以上であつ

表3 *gyrA* 復帰変異と *acrRAB* 欠失変異がキノロン系抗菌剤に対する *S. Dublin* の感受性に及ぼす影響

菌株番号	<i>gyrA</i> 変異	MIC (mg/L)											
		NA			ERFX			OFLX			CPFX		
		親株	<i>gyrA</i> 復帰変異株	<i>acrRAB</i> 欠失変異株	親株	<i>gyrA</i> 復帰変異株	<i>acrRAB</i> 欠失変異株	親株	<i>gyrA</i> 復帰変異株	<i>acrRAB</i> 欠失変異株	親株	<i>gyrA</i> 復帰変異株	<i>acrRAB</i> 欠失変異株
974	ND ^a	2	ND ^b	0.5	0.063	ND ^b	0.004	0.063	ND ^b	0.008	0.016	ND ^b	0.004
729	ND ^a	4	ND ^b	0.5	0.063	ND ^b	0.004	0.063	ND ^b	0.008	0.016	ND ^b	0.004
1242	Asp87Tyr	512	4	16	0.5	0.063	0.063	0.5	0.125	0.063	0.25	0.031	0.031
1506	Asp87Tyr	512	4	16	0.5	0.063	0.063	0.5	0.125	0.063	0.25	0.031	0.031
3468	Asp87Tyr	512	8	16	1	0.125	0.031	2	0.25	0.063	0.5	0.063	0.031
2226	Asp87Tyr	>512	8	16	1	0.125	0.031	2	0.25	0.063	0.5	0.063	0.031

^a 検出できず

^b 実施せず

た。FQ 耐性大腸菌の排菌は少なくとも1ヶ月程度は持続することを示唆する成績かも知れない。

4. おわりに

牛由来 SD の薬剤感受性に関する研究の結果、1980 年代半ばの NA の動物薬市場導入が耐性 SD の増加につながったことが示唆された。抗菌剤の慎重使用は引き続き強調されるべきであると結論した。一方で 1990 年代前半の ERFX の導入は SD の薬剤感受性に影響を与えなかった。近年、薬剤耐性菌の研究領域ではフィットネスコスト (FC) と呼ばれる概念が提唱されている [2, 3]。FC とは宿主体内における病原体の増殖や持続の低下、クリアランスの増加、あるいは宿主間における病原体の伝播の低下を意味する [3]。他の腸内細菌科の菌に比べると、サルモネラにおける FQ 耐性は一般的でない。FQ 耐性はトポイソメラーゼ変異が蓄積されることにより引き起こされるが、サルモネラにおいては変異の蓄積に伴う FC が高いために、FQ 耐性菌の出現が少ないのかも知れない [2, 4]。このように、FC は抗菌剤と菌種・血清型の組み合わせで異なる可能性が考えられる。また、薬剤耐性菌選択の場所も考慮する必要がある。ヒトの医療現場、食用動物生産の現場、あるいは市中の動物病院において使用される薬剤の種類や量は異なるはずであり、これらの諸条件を勘案した上で、動物に対する抗菌剤使用の影響は評価されるべきであろう。

謝 辞

本稿で紹介した研究は厚生労働科学研究費補助金食品の安心・安全確保推進研究事業 (H 18 - 食品 - 一般 - 003) の補助を受けて実施した。

要 約

動物に対して抗菌剤を使用することが、どの程度耐性菌を選択するかとの命題に対する科学的評価を行うことを目的として調査研究を行ったところ、キノロン系抗菌剤の使用と耐性菌選択との関

連において若干の知見を得た。

Salmonella enterica serovar Dublin (SD) は牛に特異的であり、本菌の薬剤感受性はヒトにおける抗菌剤使用の影響を受けないと考えられる。そこで我々は獣医領域における抗菌剤の導入が耐性 *S. enterica* の選択に及ぼす影響評価の一環として、過去 30 年間に分離された SD の薬剤感受性と耐性化機構を調べた。現在、優勢となっているナリジクス酸 (NA) 耐性菌は、1980 年代半ばの NA 導入後に出現した。NA 耐性菌には単一の *gyrA* 変異 (Asp87 → Tyr) が認められた。これらの株ではフルオロキノロン (FQ) に対する感受性が低下しており、FQ に対する最小発育阻止濃度は最大で 4 倍異なっていたが、エンロフロキサシン (ERFX) が導入された 1990 年代前半以降も FQ 耐性菌は認められなかった。*gyrA* 復帰変異株と *acrAB* 欠損株を用いた解析の結果から、*gyrA* 変異株は NA の使用により選択されたもので、*AcrAB-TolC* システムは FQ に対する感受性の低下に寄与している可能性が示唆された。これらの成績は、獣医領域における NA 導入が日本の牛群における SD の薬剤感受性に影響したが、ERFX の導入は影響を及ぼさなかったことを示唆している。

一方、2005 年 4 月から 2007 年 3 月までに某大学付属動物医療センターにて二次診療を受診し、細菌感染症と診断された 910 症例の伴侶動物から 59 株の大腸菌を分離し、その薬剤感受性を調査したところ、32 株 (54.2%) が ERFX 耐性であった。医療センターではキノロン系抗菌剤は使用されていないので、一般病院での治療により耐性菌が選択されたものと考えられた。

動物に対する抗菌剤使用の影響を評価するためには、薬剤耐性菌が選択圧を受けた場所や抗菌剤と菌種・血清型の組み合わせによる耐性菌出現頻度の差などを考慮する必要がある。

引用文献

- 1) Akiba M, Nakaoka Y, Kida M, et al.: Changes in antimicrobial susceptibility in a population of *Salmonella enterica* serovar Dublin isolated from cattle in Japan from 1976 to 2005. J Antimicrob

- Chemother, 60, 1235-1242 (2007)
- 2) Giraud E, Cloeckaert A, Baucheron S, et al. : Fitness cost of fluoroquinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. J Med Microbiol, 52, 697-703 (2003)
- 3) Zhang Q, Sahin O, McDermott PF, et al. : Fitness of antimicrobial-resistant *Campylobacter* and *Salmonella*. Microbes Infect, 8, 1972-1978 (2006)
- 4) Giraud E, Brisabois A, Martel JL, et al. : Comparative studies of mutations in animal isolates and experimental in vitro- and in vivo-selected mutants of *Salmonella* spp. suggest a counterselection of highly fluoroquinolone-resistant strains in the field. Antimicrob Agents Chemother, 43, 2131-2137 (1999)

Correlation between Quinolone Antimicrobial Use and the Selection of Resistance Bacteria

Masato AKIBA

National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, Japan

We investigated the antimicrobial susceptibilities and resistance mechanisms of *Salmonella enterica* serovar Dublin and *Escherichia coli* to evaluate the impact of quinolone antimicrobials use in veterinary medical practice on the selection of resistant bacteria. The introduction of nalidixic acid into the veterinary field in the mid-1980s was followed by the emergence of nalidixic acid-resistant *S. Dublin* isolates, which are now predominant. We found only a single *gyrA* mutation (Asp87Tyr) among the nalidixic acid-resistant isolates. Although the reduced susceptibilities to the fluoroquinolones were observed among the nalidixic acid resistant isolates, none of the isolates were resistant to the fluoroquinolones used in this study. The MIC data for the fluoroquinolones differed up to four-fold. Results of the susceptibility test using *gyrA* revertants and *acrAB* mutants suggest that the isolates with the *gyrA* mutation were selected by the use of nalidixic acid, and the AcrAB-TolC system account for the decreased fluoroquinolone susceptibilities. These data suggest that the introduction of nalidixic acid in veterinary medicine seemed to affect the susceptibilities of *S. Dublin* among the cattle population in Japan, while the introduction of fluoroquinolones has not clearly affected.

On the other hand, 32 (54.2%) out of 59 *E. coli* isolates from companion animals were resistant to enrofloxacin. The correlation between quinolone antimicrobial use and the selection of resistant bacteria in animal hospitals should be systematically investigated.