

馬糞便由来大腸菌の薬剤感受性調査

江崎英剛

(財)畜産生物科学安全研究所 (〒 252-0132 相模原市橋本台 3-7-11)

1. 目的

馬は他の家畜と異なり、食肉用ではなく農用、荷用、軍用など、いわゆる役用家畜として使用されてきた。近年、先進国では機械化が進むにつれて、その用途は競争用、愛玩用、乗用へと変化している。これらの用途で飼育されている馬は人と直接接触する機会を有することから、馬と人との間で薬剤耐性菌が伝播する可能性が考えられる。実際、日本国外においては、そのような事例も報告されている [1, 2]。

馬において成長促進目的で抗菌性物質が飼料添加されることはなく、馬に対して使用される抗菌性物質のほとんどは、感染症の治療もしくは予防目的である。後腸発酵動物である馬は、ある種の抗菌薬の投与によって盲腸や結腸の腸内細菌叢が攪乱され、重篤な腸炎を起しやすいたことが知られている [3]。そのため、馬に対して使用される抗菌薬の種類は限られており、その投与も慎重に行われている [4]。これらのことから、馬は抗菌薬の慎重使用が徹底された動物とも考えられる。そこで、日本国内で飼育されている馬における薬剤耐性菌に関する知見を得ることを目的に、日本中央競馬会（以下、競馬会）関連施設で飼育されている馬を調査対象として、馬糞便より分離された大腸菌の薬剤感受性調査を実施した。

2. 材料と方法

(1) 馬糞便の採材

競馬会関連5施設を調査対象として、2009年11月から2010年4月にかけて各施設より健康な馬10頭から糞便を採材した。採材した糞便は滅菌バッグに入れ、冷蔵状態で(財)畜産生物科学安全研究所へと輸送し、採材後3日以内に検査に供した。また、各馬個体に対する抗菌薬投与歴について、集計・調査した。

(2) 馬糞便からの大腸菌の分離

馬糞便からの大腸菌の分離・同定はJVARMの方法に従った [5]。糞便をDHL寒天培地に直接接種し、37℃で一晩培養した。大腸菌と思われるコロニーを各検体12株ずつニュートリエントアガー培地に分離・培養し、Api 20 Eを用いて同定した。糞便1検体につき10株の大腸菌(計500株)を分離・同定し、薬剤感受性試験に供するまでスキムミルク培地に懸濁し、-80℃で保存した。

(3) 薬剤感受性試験

大腸菌分離株500株について、アンピシリン、セファゾリン、セフトチオフル、ジヒドロストレプトマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、コリスチン、ナリジクス酸、オフロキサシン及びST合

共同研究者：中島隆二（畜産生物科学安全研究所）、丹羽秀和（日本中央競馬会 競走馬総合研究所）、奥河寿臣（日本中央競馬会 競走馬総合研究所）

本稿は平成23年11月19日に開催された第38回動物用抗菌剤研究会シンポジウムにおける講演の概要である。

剤（スルファメトキサゾール／トリメトプリム）の計 12 薬剤に対する MIC を、CLSI 微量液体希釈法により測定した。基本的には CLSI の定めるブレイクポイントに従って耐性の判定を行ったが、CLSI がブレイクポイントを定めていないジヒドロストレプトマイシン及びコリスチンについては、JVARM の定めるブレイクポイントを採用した。

(4) セフチオフル耐性大腸菌の解析

セフチオフル耐性大腸菌 4 株に対して、シカベータテスト（関東化学）により β ラクタマーゼのクラスを調べた後、マルチプレックス PCR により CTX-M β ラクタマーゼ遺伝子型別を実施した [6]。プラスミド接合伝達試験はフィルターメイティング法により行い [7]、レシピエント株にはリファンピシン耐性大腸菌 ML4903 株を供した。プラスミド型別は、PCR レプリコン型別法により行った [8]。PCR の増幅確認には、D-QUICK（カネカ）を用いた。

3. 結果

競馬会関連 5 施設の馬 50 頭から 500 株の大腸菌を分離した。これらの大腸菌分離株の 12 薬剤に対する MIC を表 2 に示した。ジヒドロストレプトマイシン及び ST 合剤に対する耐性が特に高く、次いでテトラサイクリン、アンピシリン耐性が高かった。セファゾリン、セフチオフル、カナ

マイシン、ゲンタマイシン及びクロラムフェニコール耐性は 1% 未満であり、コリスチン、ナリジクス酸及びオフロキサシンには全て感受性であった。

大腸菌分離株の薬剤耐性プロファイルについて、おおよそ 70% が供試 12 薬剤全てに感受性を示し、多剤耐性株（3 剤以上に耐性）の割合は 10% 未満であった（表 3）。調査対象馬についてみると、70%（35/50）の馬は薬剤耐性大腸菌を保有しており、抗菌薬投与歴の有無で区別すると、投与歴が有る馬の 81% が、無い馬では 53% がそれぞれ耐性菌を保有していた。

セフチオフル耐性大腸菌は施設 D の 2 頭から 4 株分離された。これらについて β ラクタマーゼ形別及びプラスミド試験を実施したところ、いずれも CTX-M グループ 9 の β ラクタマーゼを、IncN 型の接合伝達性プラスミド上に保有しているものと思われた。

4. 考察

馬において、感染症治療に用いられる抗菌薬の種類は限られており、ジヒドロストレプトマイシン-ペニシリン合剤、もしくはセファロチンが第一選択薬としてよく用いられる。他にもゲンタマイシン、ミノサイクリン、ホスホマイシンなども用いられ、これらの抗菌薬の効果が認められない場合に、エンロフロキサシンが選択される。また、通常、抗菌性飼料添加物は用いられない。以上の

表 1 調査対象施設及び馬の情報

調査対象施設		調査対象馬		
調査対象施設	年齢			抗菌薬投与歴 ^{a, b)}
A	研究所	1-20	3/10	CET (1), SM/PCG (2)
B	馬事公苑	5-17	7/10 ^{c)}	CET (3), MINO (1), SM/PCG (4), SMMX (1)
C	競馬学校	3-18	5/10	GM (1), SM/PCG (4)
D	トレーニングセンター	3-16	10/10	CET (6), KM (2), SM/PCG (2)
E	トレーニングセンター	7-19	2/10	KM (1), SM/PCG (1)

a) 数字は抗菌剤投与馬 / 調査対象馬を示す。薬剤名及び括弧内の数字はそれぞれ投与した抗菌剤及び頭数を示す。

b) セファロチン；CET, GM；ゲンタマイシン, KM；カナマイシン, MINO；ミノサイクリン, SMMX；スルファメトキサゾール, SM/PCG；SM/PCG

c) 本施設では抗菌剤投与された馬のうち 2 頭が 2 種類の抗菌剤を投与されており、1 頭は SMMX 及び CET を、他の 2 頭は SM/PCG 及び SMMX を投与されている。

表2 日本国内で飼育されている馬50頭から分離された大腸菌500株のMIC分布

抗菌剤	MIC (mg/ml)											耐性		
	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128	菌数	(%)
				(2.38/0.125)	(4.75/0.25)	(9.5/0.5)	(19/1)	(38/2)	(76/4)	(152/8)	(>152/8)			
ABPC				20	114	228	120	8				10	10	(2.0)
CEZ				198	281	17						4	4	(0.8)
CTF			496								4		4	(0.8)
DSM				1	61	282	36	2	6	4	108		118	(23.6)
KM				5	218	242	34					1	1	(0.2)
GM			432	62	5				1				1	(0.2)
CL		16	141	212	125	6							0	(0.0)
CP					10	79	362	48			1		1	(0.2)
TC				61	335	77	9	10			8		18	(3.6)
NA				7	69	343	81						0	(0.0)
OFLX	498	1	1										0	(0.0)
SMX/TMP					379	23	37	6	3	1		51	52	(10.4)

括弧内の数字はスルファメトキサゾール/トリメトプリムに対するMICを示す。縦の1本線及び2本線はそれぞれ CLSI 及びJVARMによるブレイクポイントを示す。白色の領域は各薬剤において供試した希釈段階を示す。
 ABPC; アンピシリン, CEZ; セファゾリン, CTF; セフトロファン, DSM; ジヒドロストレプトマイシン, KM; カナマイシン, GM; ゲンタマイシン, CL; コリスチン, CP; クロラムフェニコール, TC; テトラサイクリン, NA; ナリジクス酸, OFLX; オフロキサシン, SMX/TMP; スルファメトキサゾール/トリメトプリム

表3 馬由来大腸菌の薬剤耐性プロファイル

耐性薬剤数 ^{a)}	薬剤耐性プロファイル ^{b)}	菌株数					Total	(%)
		A	B	C	D	E		
0	感受性	65	78	83	46	76	348	(69.6)
	DSM	25	10	10	18	14	77	(15.4)
1	TC		3	1	18		22	(4.4)
	SMX/TMP				11		11	(2.2)
	ABPC-DSM	4					4	(0.8)
2	DSM-KM				1		1	(0.2)
	DSM-TC	1			1		2	(0.4)
	DSM- SMX/TMP	4	8	3		10	25	(5.0)
	ABPC-TC-SXT				1		1	(0.2)
3	DSM-CP-TC	1					1	(0.2)
	DSM-TC- SMX/TMP			3			3	(0.6)
4	ABPC-CEZ-CTF-DSM					4	4	(0.8)
	ABPC-DSM-GM- SMX/TMP		1				1	(0.2)

a) 供試12薬剤に対する耐性薬剤数

b) 抗菌薬の略語は表2参照

ことから、本試験での調査対象馬は、抗菌薬の慎重使用が徹底された動物と見なすことができる。この観点から、2009年度のJVARM調査結果 [9] をもとに馬とそれ以外の畜産動物由来大腸菌との薬剤感受性の比較を行った。ジヒドロストレプトマイシン以外の薬剤では、馬由来大腸菌は他の畜産動物由来大腸菌よりも低い耐性率を示した (表4)。一般的に、馬以外の畜産動物では抗菌性飼料添加物を摂取するため、また、鶏や豚においては抗菌薬が群投与されることが多いため、馬よりも多くの抗菌薬を摂取するものと考えられる。また、今回調査対象とした馬は個別に独房で飼育されていた。これらの要因により、調査対象馬における耐性菌の出現・選択の機会は低く、さらに個体間での耐性菌が伝播する可能性も低かった可能性が考察される。

馬由来大腸菌において、ジヒドロストレプトマイシン耐性が比較的高かった理由については不明である。本調査において、ジヒドロストレプトマイシンはもっとも多くの馬に使用された抗菌薬であったが (調査対象馬 50 頭のうち 13 頭に使用)、いずれのケースにおいても、ジヒドロストレプトマイシン-ペニシリン合剤として投与されており、ペニシリンと同系統の抗菌薬であるアンピシリンに対する耐性はさほど高くはなかった。さらに、ジヒドロストレプトマイシン耐性大腸菌は、本剤を投与した馬の 53.5% (7/13) から分離されているのに対して、非投与馬からは 62.7% (23/37) の割合で分離された。このため、馬由来大腸菌のジヒドロストレプトマイシン耐性は、本薬剤の投

与以外にも高い影響を受ける要因を有するものと考えられた。一つの可能性として、本薬剤の耐性遺伝子がインテグロンに存在することが挙げられる。Kadlecらは、抗菌薬の選択圧がかからない条件下においても、インテグロン性の薬剤耐性は長く留まることを報告している [10]。

人間や畜産動物において、ESBL産生大腸菌の出現は重要な問題となっている。本調査においても、施設Dで飼育する2頭の馬から、セフトオフル耐性大腸菌が4株分離された。諸外国において報告はあるものの [1, 11]、日本国内で飼育される馬からの初めてのESBL産生大腸菌の分離事例となる。これらの2頭の馬は、採材日の2ヵ月以内に第一世代セファロスポリン系抗菌薬であるセファロチンと投与されていたことが確認されたが、セフトオフルの投与は確認できなかった。これら4株はいずれもCTX-Mグループ9のβラクタマーゼをIncN型インテグロンに持つことが確認された。

結論として、日本国内で飼育される馬から分離された大腸菌は他の畜産動物から分離された大腸菌と比較して、ジヒドロストレプトマイシン以外の抗菌薬に対しては耐性率は低かった。慎重使用の徹底が影響した可能性が考えられる。しかし、馬において、安全性が確認された限られた抗菌薬しか使用できないという状況は、同様の抗菌薬を繰り返し使用する可能性が高く、長期的な視点で考えると、特定の抗菌薬に対する耐性菌が出現・蔓延する可能性も危惧される。

馬の治療に当たる獣医師においては、このよう

表4 馬及び他の家畜由来大腸菌の薬剤耐性率の比較

抗菌薬 ^{a)}	耐性率 (%)				
	馬	牛 ^{b)}	豚 ^{b)}	採卵鶏 ^{b)}	肉用鶏 ^{b)}
ABPC	2.0	9.4	28.3	23.0	43.8
DSM	23.6	17.7	50.7	11.5	34.4
TC ^{c)}	3.6	20.0	65.2	51.0	27.4
NA	0.0	4.2	10.1	4.4	38.5
OFLX ^{c)}	0.0	0.4	2.9	2.7	13.5

a) 抗菌薬の略語は表2参照。

b) JVARM 2009年度調査結果 [9]。

c) JVARM調査においては、TC及びOFLXの代わりに、それぞれオキシテトラサイクリン及びエンロフロキサシンを供試している。

なりリスクを理解し、適切な抗菌薬を選択し、使用するよう心がけることが重要と思われる。

引用文献

- 1) Dolejska M, Duskova E, Rybarikova J, Janoszowska D, Roubalova E, Dibdakova K, Maceckova G, Kohoutova L, Literak I, Smola J, Cizek A: Plasmids carrying blaCTX-M-1 and qnr genes in *Escherichia coli* isolates from an equine clinic and a horseback riding centre. J Antimicrob Chemother, 66, 757-764 (2011)
- 2) Dunowska M, Morley PS, Traub-Dargatz JL, Hyatt DR, Dargatz DA: Impact of hospitalization and antimicrobial drug administration on antimicrobial susceptibility patterns of commensal *Escherichia coli* isolated from the feces of horses. J Am Vet Med Assoc, 228, 1909-1917 (2006)
- 3) AlJassim RAM, Andrews FM: The bacterial communicat of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers. Vet Clin Equine, 25, 199-215 (2009)
- 4) Haggett EF, Wilson WD: Overview of the use of antimicrobials for the treatment of bacterial infections in horses. Equine Vet Educ, 20, 433-448 (2008)
- 5) Kijima-Tanaka M, Ishihara K, Morioka A, Kojima A, Ohzono T, Ogikubo K, Takahashi T, Tamura Y: A national surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Japan. 51, 447-451 (2003)
- 6) Xu L, Ensor V, Gossain S, Nye K, Hawkey P: Rapid and simple detection of blaCTX-M genes by multiplex PCR assay. J Med Microbiol, 54, 1183-1187 (2005)
- 7) Komatsu M, Aihara M, Shimakawa K, Yamanaka T, Matsuo S: Detection of extended-spectrum β -lactamases producing Enterobacteriaceae in feces [in Japanese]. Kansenshogaku Zasshi 74, 250-258 (2000)
- 8) Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ: Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. J Microbiol Methods, 63, 219-228 (2005)
- 9) National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Japan, 1999-2009. Information on the results of JVARM study. (in Japanese) http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/
- 10) Kadlec K, Schwarz S: Analysis and distribution of class 1 and class 2 integrons and associated gene cassettes among *Escherichia coli* isolates from swine, horses, cats and dogs collected in the BfT-GermVet monitoring study. J Antimicrob Chemother, 62, 469-473 (2008)
- 11) Maddox TW, Williams NJ, Clegg PD, O'Donnell AJ, Dawson S, Pinchbeck GL: Longitudinal study of antimicrobial-resistant commensal *Escherichia coli* in the faeces of horses in an equine hospital. Prev Vet Med 100, 134-145 (2011)

Antimicrobial susceptibility of fecal *Escherichia coli* from horses in Japan

Hidetake ESAKI

*Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology,
3-7-11, Hashimotodai, Midori-ku, Sagami-hara, 252-0132 Kanagawa*

The resistance to antimicrobial agents in animals is an emerging problem worldwide. In this study, we examined MICs of 12 antimicrobial drugs against 500 *Escherichia coli* isolates from 50 horses in 5 Japan Racing Association associated facilities. Equine *E. coli* isolates showed relatively lower resistance than other domestic animals except for dihydrostreptomycin. The prudent use of antimicrobials for horses may account for it. The ceftiofur resistances were detected in the isolates from 2 horses in one facility. This is the first report of the ceftiofur resistant *E. coli* of horse origin in Japan.

討 論 (座長：澤田拓士 理事長, 金井久 群馬県家畜衛生研究所)

質問 (藤本修平, 東海大学)

畜産全体で考えたとき、競走馬はどのくらいいるのでしょうか？

答 (江寄英剛)

19年度、国内の馬は83,000頭で半分が競走馬である。ちなみに牛は450万頭、鶏は一億羽いる。

質問 (浅井鉄夫, 動物医薬品検査所)

薬の使用について、投与からの期間などについては調べていますか。

答 (江寄英剛)

投与からの期間については別にデータあります。

質問 (浅井鉄夫, 動物医薬品検査所)

CTX-MのプラスミドはDSM耐性をもっていたか。

答 (江寄英剛)

DSM耐性については確認していない。接合伝達試験に反応したのはβラクタム系のみでした。

質問 (金井久, 群馬県家畜衛生研究所)

各施設で共通して例えばマイシリン、カナマイシンを使用していたが、馬ではこれらの薬剤を優先的に使うのですか。

答 (江寄英剛)

今回は競走馬だから用いている程度の知識しかありません。理由はわかりません。