

抗菌薬使用による家畜由来大腸菌の交差耐性および 共耐性の農場レベルでの発現状況について

原田和記

農林水産省動物医薬品検査所（〒 185-8511 東京都国分寺市戸倉 1-15-1）

1. はじめに

動物用抗菌薬の使用は、家畜の感染症の治療手段として必要不可欠である一方で、畜産分野における薬剤耐性菌の出現および増加に関与している。特に、家畜に対する病原菌における薬剤耐性の発現は、治療に使用される動物用抗菌薬の有効性の低下につながるおそれがある。また、薬剤耐性を獲得した食中毒菌などは、食品を介して人に伝播し、医療分野の抗菌薬治療に影響を及ぼす可能性がある。この背景から、動物用抗菌薬のリスク評価および家畜に分布する薬剤耐性菌のリスク管理は、国際的にも重要課題とされており、その遂行にあたっては抗菌薬の使用が薬剤耐性菌の発現および分布に及ぼす影響についての科学的な知見が必要となる。

特定の薬剤耐性機構の関与により、使用された抗菌薬に対する耐性と同時に、それ以外の抗菌薬に対する耐性も誘導する可能性がある。構造的に類似した複数薬剤に対する耐性は交差耐性と定義され、*tet* 遺伝子によるテトラサイクリン系 (TCs) 薬剤に対する耐性などにみられる [5]。一方で、構造的に異なる複数薬剤に対する耐性を示す共耐性の存在が知られている。共耐性の発現により、使用された薬剤以外の系統の薬剤耐性が共選択される可能性がある [4]。このことから、抗菌薬の使用又は使用中止が薬剤耐性の分布に及ぼす影響を評価する上で、共耐性は重要な交絡因子となる。これらの耐性機構については、分子レベル

で多くの調査が実施されているが、抗菌薬使用の現場である農場レベルでの影響に関する知見は少ない。

大腸菌は、家畜の腸内細菌叢として普遍的に分布しているため、全般的な抗菌薬使用による選択圧を測る指標菌として扱われている。一方で、病原性を有する大腸菌は下痢などを主徴とする大腸菌症の原因であり、抗菌薬治療の対象となる。この背景から、家畜由来大腸菌の薬剤感受性調査は、わが国 (JVARM) [18] を含めた多くの国において実施されている。今回、JVARM によって収集された家畜由来大腸菌をモデルに、抗菌薬の使用が農場レベルでの交差耐性および共耐性の発現に与える影響について検討した成績について報告する。

2. 国内における病畜由来大腸菌の抗菌薬感受性

大腸菌症は畜産分野において遭遇する機会の多い疾病の一つであり、その経済的被害は大きい。そのため、わが国において大腸菌症を適応症とする抗菌薬が多く承認されている。今回、大腸菌症の治療を目的とした抗菌薬使用による選択圧の程度を測ることを目的として、病畜由来大腸菌の薬剤感受性を調査した [6]。

供試菌株は、平成 13 ～ 15 年度に全国の家畜保健衛生所などで病性鑑定により大腸菌症または大腸菌の感染による疾病と診断された病畜の病変部位より分離された大腸菌（牛由来 57 株、豚由来

118 株)とした。薬剤感受性試験は、アンピシリン (ABPC)、セファゾリン (CEZ)、ジヒドロストレプトマイシン (DSM)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、コリスチン (CL)、クロラムフェニコール (CP)、オキシテトラサイクリン (OTC)、ビコザマイシン (BCM)、ナリジクス酸 (NA)、エンロフロキサシン (ERFX)、トリメトプリム (TMP) の計 12 薬剤について、CLSI 標準法に準拠した寒天平板希釈法により実施した。

結果として、OTC に対する耐性率が最も高く (78.3%)、続いて DSM (70.3%)、ABPC (49.1%) の順に高い耐性率を示した (表 1)。これらと同一系統の TCs、アミノグリコシド系 (AGs) および ペニシリン系 (PCs) 薬剤は、いずれも細菌性感染症の第一次選択薬であり、使用量が多い [19]。このことから、病畜由来大腸菌の薬剤感受性には、第一次選択薬の使用による交差耐性の発現が強く反映されていると考えられる。

また、Kijima ら [12] の報告による健康畜由来株の薬剤耐性率と比較したところ、牛では BCM を除く 11 薬剤で、豚では供試した全ての薬剤に

対する耐性率が、病畜由来株で有意に高かった。したがって、病畜の治療を目的とした抗菌薬の使用による選択圧は、CP などの通常治療に使用されない薬剤を含む全般的な薬剤に対する耐性率を上昇させていることが示唆された。

また、牛由来株と豚由来株の耐性率を比較すると、CL では豚由来株が有意に高く (牛; 12.1%, 豚; 35.6%), CEZ では牛由来株が有意に高かった (15.5%, 4.2%)。わが国において、CL は牛に比べ豚での使用量が多く [17]、また、CEZ は牛のみに承認されていることから、両畜種間の CL および CEZ の耐性率の違いは、それぞれの畜種における薬剤の使用状況の違いに起因していることが示唆された。

さらに、PCR により各種の病原性遺伝子 (*stx1*, *stx2*, *stx2e*, *hlyA*, *eaeA*) の保有状況を調査した結果、豚由来 118 株中 61 株が *stx2e* を主に保有する志賀毒素産生性大腸菌 (STEC) であり、non-STEC (57 株) に比べて、CL と ERFX に対する耐性率が高かった。一方で、牛由来 57 株中 18 株が *stx1* を主に保有する STEC であり、牛由来 STEC には、*hlyA* (11 株), *eaeA* (13 株) を保有

表 1 病畜由来大腸菌の薬剤感受性成績

供試薬剤 ^{a)}	MIC (mg/L)															ブレイク ポイント (mg/L)	耐性株数 (%)			
	<0.125	0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	>512		合計 (n=175)	牛 (n=57)	豚 (n=118)	
ABPC					1	3	69	13	3			3	1	2	27	53	32 ^{b)}	86 (49.1)	34 (58.6)**	52 (44.1)**
CEZ						65	52	31	12	1	7		2	5			32 ^{b)}	14 (8.0)	9 (15.5)**	5 (4.2)**
DSM						10	26	6	5	5	9	18	28	31	16	21	32 ^{c)}	123 (70.3)	44 (75.8)**	79 (66.9)**
KM					1	25	68	19	4	1	1		3	8	8	37	64 ^{b)}	56 (32.0)	22 (37.9)**	34 (28.8)*
GM	1			14	88	44	2	2	2	1	8	7	4	2			16 ^{b)}	22 (12.6)	5 (8.6)**	17 (14.4)**
CL				22	49	55	5	25	18	1							2 ^{c)}	49 (28.0)	7 (12.1)**	42 (35.6)**
CP							14	44	41	5	9	9	6	25	17	5	32 ^{b)}	71 (40.6)	20 (35.1)**	51 (43.2)**
OTC				1	1	29	6	1				1	15	100	17	4	16 ^{c)}	137 (78.3)	42 (72.4)**	95 (80.5)**
BCM									4	69	88	4	1	7	2		128 ^{c)}	10 (5.3)	1 (1.7)	9 (7.6)**
NA						4	42	53	5	7	6	5	11	11	3	28	64 ^{c)}	58 (33.1)	17 (29.3)**	41 (34.7)**
ERFX	112	9	15	8	4	7	6	8	4	2							4 ^{b)}	20 (11.4)	6 (10.3)**	14 (11.9)**
TMP	1	1	16	40	35	4	5	2	2						69	128 ^{c)}	69 (39.4)	18 (31.6)**	51 (43.2)**	

^{a)} 動物用抗菌剤研究会制定の略号に従った。

^{b)} CLSI によって設定されたブレイクポイント

^{c)} 微生物学的に設定されたブレイクポイント

*, ** Kijima ら [12] によって報告された健康畜の耐性率との有意差が認められていることを示す (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$)

する株が含まれていたが、これらの病原性因子と薬剤耐性の分布との関連は認められなかった。一般に、豚では牛と異なり、STEC 感染による疾病(浮腫病など)と Non-STEC 感染による疾病(下痢)では、臨床症状が大きく異なることが知られており [16]、それぞれの症状に対する薬剤の使用状況を反映していることが示唆された。

以上のことから、大腸菌症の治療を目的とした抗菌薬の使用は、交差耐性などの発現を介して、農場に分布する薬剤耐性菌の選択に大きく関与していることが明らかとなった。また、由来動物や病原性因子は、その選択圧の違いを生じさせる要因であると考えられる。

3. 病畜由来大腸菌の CP 耐性の維持における共耐性の関与

CP は広域なスペクトルを有することから、動物用医薬品として畜産分野で広く使用されていた。その後、CP は人に対して再生不良性貧血などの副作用を引き起こすことが明らかとなり [20]、わが国では 1998 年に食用動物に対する使用が中止されている。しかしながら、近年の調査により病畜由来大腸菌では健康畜由来大腸菌に比べ、高い耐性率が認められた [6]。そこで、CP 以外の薬剤の使用が、CP 耐性大腸菌の発現および維持に及ぼす影響について、共耐性の関与を中

心に調査を実施した [7]。

既報 [6] で供試された病畜の牛および豚由来大腸菌 175 株 (CP 耐性 71 株および感受性 104 株) を調査対象とした。供試株に対して、CLSI 標準法に準拠した寒天平板希釈法によりフェニコール類 (フロルフェニコール (FFC) およびチアンフェニコール (TP)) に対する感受性を調査した。その結果、FFC および TP に耐性を示した株はいずれも CP に交差耐性を示したことから、FFC や TP の使用により CP 耐性大腸菌が選択されている可能性が示唆された。さらに、FFC および TP の合計使用量は牛 (約 0.9t) に比べ豚 (約 11.2t) で多いこと [17]、また、CP 中止後の健康畜由来大腸菌 (指標大腸菌) の CP 耐性率の減少程度が、豚 (27.1% → 22.3%) では牛 (16.6% → 3.1%) に比べて小さいことから [11, 12]、CP 耐性の選択に対する交差耐性の関与は、牛に比べて豚で大きいことが示唆された。

また、PCR により数種の CP 耐性遺伝子 (*cat1*, *cat2*, *cmlA*, *flo*) を検出したところ、牛由来 CP 耐性株では *cat1* (90.0%)、豚由来株では *cat1* (54.9%) と *cmlA* (39.2%) が高率に認められた (表 2)。これら CP 耐性遺伝子保有株は非保有株に比べ、牛由来株では ABPC, DSM, OTC および TMP に対して、豚由来株では DSM および TMP に有意に高い耐性率を示した (表 3)。

さらに、クラス 1 インテグロンの保有状況を

表2 病畜から分離された大腸菌のCP耐性株およびCP感受性株における各種CP耐性遺伝子の保有状況

CP耐性遺伝子	CP耐性株 (n = 71)			CP感受性株 (n=104)		
	牛	豚	合計	牛	豚	合計
<i>cat1</i>	16	24	40	1	2	3
<i>cmlA</i>	1	15	16	0	0	0
<i>cat1 and cmlA</i>	1	2	3	0	0	0
<i>cat1, cat2, and cmlA</i>	0	2	2	0	0	0
<i>cat1 and flo</i>	1	0	1	0	0	0
<i>cat2 and cmlA</i>	0	1	1	0	0	0
<i>cat2 and flo</i>	0	1	1	0	0	0
<i>flo</i>	1	0	1	0	0	0
—	0	6	6	36	65	101
合 計	20	51	71	37	67	104

表3 病畜から分離された大腸菌のCP耐性遺伝子保有株および非保有株における各種抗菌薬に対する耐性率

耐性を示す 薬剤	牛由来株 (%)		豚由来株 (%)		
	<i>cat1</i> (n=19)	None (n=36)	<i>cat1</i> (n=30)	<i>cmlA</i> (n=20)	None (n=71)
ABPC	89.5 ^{a)}	41.7 ^{b)}	50.0	45.0	40.8
DSM	100 ^{a)}	63.9 ^{b)}	76.7 ^{c)}	95.0 ^{a)}	54.9 ^{b), d)}
OTC	94.7 ^{c)}	61.1 ^{d)}	93.3	85.0	74.6
TMP	68.4 ^{a)}	13.9 ^{b)}	56.7 ^{c)}	70.0 ^{a)}	29.6 ^{b), d)}

a)-d) CP 耐性遺伝子保有株および非保有株との比較により、有意差が認められた耐性率
(a), b) $P<0.01$; c), d) $P<0.05$)

調べたところ、CP 耐性遺伝子保有株 (75.0%) で非保有株 (23.4%) より多く認められた。PCR-mapping により、全てのクラス 1 インテグロン内に AGs 薬剤もしくは TMP (およびオルメトプリム (OMP)) または双方の薬剤に対する耐性遺伝子が検出された (表 4 および 5)。

このことから、AGs 薬剤又は TMP (又は OMP) の使用、牛ではさらに PCs 又は TCs 薬剤の使用による選択圧が CP 耐性大腸菌の共選択に加担していることが示唆された。したがって、牛および豚における CP 使用中止後の CP 耐性の維持には、同系統の薬剤の使用による交差耐性に加

え、インテグロンなどによる共耐性が関与していると考えられる。

4. 抗菌薬の使用による交差耐性および共耐性が豚由来薬剤耐性大腸菌の分布に及ぼす農場レベルの影響

JVARM では、農場からの各種細菌の採取時に、各農場における過去 6 ヶ月間の動物用抗菌薬の使用状況について聞き取り調査が実施されている [1]。また、全畜種のうち動物用抗菌薬の使用量が最も多いのは豚である [19]。そこで、養豚場

表4 牛由来のCP耐性遺伝子保有大腸菌におけるインテグロンの分布状況および耐性パターン

CP 耐性遺伝子	可変領域 (kb)	耐性遺伝子 ^{a)}	耐性パターン
<i>cat1</i> (17)	1.0 (4)	<i>aadA1</i> (2) <i>aadA2</i> (2)	ABPC-DSM-OTC (2) ABPC-DSM-OTC-TMP (2)
	1.6 (4)	<i>dhfrI</i> and <i>aadA1</i> (3) <i>dhfrXVII</i> and <i>aadA2</i> (1)	ABPC-DSM-OTC-TMP (3) DSM-OTC-TMP (1)
	1.9 (4)	<i>dhfrXII</i> and <i>aadA2</i> (4)	ABPC-DSM-OTC-TMP (4)
	2.4 (1)	<i>dhfrI</i> and <i>cat1</i> (1)	DSM-OTC-TMP (1)
	1.6 and 1.9 (1)	<i>dhfrI</i> , <i>aadA1</i> , <i>dhfrXII</i> , and <i>aadA2</i> (1)	ABPC-DSM-OTC-TMP (1)
	— (3)	— (3)	ABPC-DSM (1) ABPC-DSM-OTC (2)
<i>cmlA</i> (1)	3.0 (1)	<i>dhfrI</i> , <i>aadA1</i> , and <i>cmlA</i> (1)	ABPC-DSM-OTC-TMP (1)
<i>cat1</i> and <i>cmlA</i> (1)	— (1)	— (1)	ABPC-DSM-OTC-TMP (1)
<i>cat1</i> and <i>flo</i> (1)	1.0 (1)	<i>aadA1</i> (1)	ABPC-DSM-OTC (1)
<i>flo</i> (1)	1.0 (1)	<i>aadA1</i> (1)	ABPC-DSM-OTC (1)

() 内の数字は株数を示す

a) *aadA1* および *aadA2* はストレプトマイシン耐性遺伝子、*dhfrI*, *dhfrXII* および *dhfrXVII* はメトプリム耐性遺伝子を示す

表5 豚由来のCP耐性遺伝子保有大腸菌におけるインテグロンの分布状況および耐性パターン

CP 耐性遺伝子	可変領域 (kb)	耐性遺伝子 ^{a)}	耐性パターン
<i>cat1</i> (26)	1.0 (9)	<i>aadA1</i> (9)	DSM (1)
			OTC (1)
			DSM-OTC (1)
			DSM-OTC-TMP (2)
			ABPC -DSM-OTC (1)
			ABPC -TMP (1)
			ABPC -DSM-OTC-TMP (2)
	1.6 (3)	<i>dhfrI</i> and <i>aadA1</i> (1)	ABPC -DSM-OTC-TMP (1)
		<i>dhfrVII</i> and <i>aadA1</i> (1)	ABPC -DSM-OTC-TMP (1)
		<i>dhfrXVII</i> and <i>aadA2</i> (1)	ABPC -DSM-OTC-TMP (1)
	1.9 (4)	<i>dhfrXII</i> and <i>aadA2</i> (4)	OTC-TMP (1)
			ABPC -OTC-TMP (1)
			DSM-OTC-TMP (1)
			ABPC -DSM-OTC-TMP (1)
	1.0 and 1.6 (2)	<i>aadA1</i> , <i>dhfrXVII</i> , and <i>aadA1</i> (2)	DSM-OTC-TMP (2)
<i>cmlA</i> (15)	— (8)	— (8)	OTC (3)
			DSM-OTC (1)
			ABPC -DSM-OTC (3)
			ABPC -DSM-OTC-TMP (1)
	0.5 (2)	— (2)	ABPC -DSM (1)
			DSM-OTC (1)
	1.0 (3)	<i>aadA1</i> (2)	DSM-OTC-TMP (1)
		<i>dhfrXII</i> (1)	ABPC -DSM-OTC-TMP (1)
	1.6 (1)	<i>dhfrI</i> and <i>aadA1</i> (1)	DSM-OTC-TMP (1)
			ABPC -DSM-OTC-TMP (1)
	1.9 (6)	<i>dhfrXII</i> and <i>aadA2</i> (6)	DSM-TMP (1)
			DSM-OTC-TMP (4)
			ABPC -DSM-OTC-TMP (1)
	— (3)	— (3)	ABPC -DSM (1)
			DSM-OTC (1)
			ABPC -DSM-OTC-TMP (1)
<i>cat1</i> and <i>cmlA</i> (2)	— (2)	— (2)	OTC (1)
<i>cat1</i> , <i>cat2</i> , and <i>cmlA</i> (2)	1.9 (2)	<i>dhfrXII</i> and <i>aadA2</i> (2)	DSM-OTC (1)
<i>cat2</i> and <i>cmlA</i> (1)	1.9 (1)	<i>dhfrXII</i> and <i>aadA2</i> (1)	ABPC -DSM-OTC-TMP (2)
<i>cat2</i> and <i>flo</i> (1)	1.9 (1)	<i>dhfrXII</i> and <i>aadA2</i> (1)	ABPC -DSM-OTC-TMP (1)
			ABPC -DSM-OTC-TMP (1)

() 内の数字は株数を示す

^{a)} *aadA1* および *aadA2* はストレプトマイシン耐性遺伝子, *dhfrI*, *dhfrVII*, *dhfrXII* および *dhfrXVII* はメトブリン耐性遺伝子を示す

における抗菌薬使用歴を基に、その使用が農場レベルの薬剤耐性菌の分布に及ぼす影響について調査した [9]。

調査対象は、平成 13 年～ 16 年度に健康豚に由来する指標大腸菌 545 株とした。薬剤感受性試験は、CLSI 標準法に準拠した寒天平板希釈法により、ABPC、DSM、OTC、KM、TMP の 5 薬剤に対して実施した。

農場における抗菌薬の使用歴の聞き取り調査の結果、少なくとも 1 薬剤以上に暴露されていた豚由来の株は 189 株 (34.7%) であり、TCs 薬剤 (66 株, 12.1%), PCs 薬剤 (34 株, 6.2%), TMP (又は OMP) + サルファ系 (ST) 合剤 (33 株, 6.1%), ベンジルペニシリンプロカイン + (ジヒドロ) ストレプトマイシン (PS) 配合剤 (22 株, 4.0%) が主に使用されていた。また、356 株 (65.3%) が抗菌薬使用歴のない豚から分離された。

これらの抗菌薬使用歴に基づいて、薬剤耐性率を各薬剤の暴露群ごとに、統計学的に比較検討した結果を表 6 に記した。薬剤非暴露群と比較したところ、各薬剤暴露群において、使用された薬剤と同系統の薬剤に対する耐性率の上昇が認められ、その上昇率は他系統の薬剤の使用による影響よりも大きいことが明らかとなった。これまでの調査により、健康畜由来大腸菌の各薬剤の耐性率は、同系統の抗菌薬の国内販売量に比例することが明らかとされている [2]。今回の農場レベルの

調査結果は、この国レベルの調査結果を支持するものである。これらのことから、抗菌薬使用による交差耐性の発現は、薬剤耐性菌の分布に影響を及ぼす重要な要素と考えられる。

また、他系統の薬剤に対する耐性に及ぼす影響について、各々の薬剤暴露群における耐性率および多剤耐性の分布状況を基に調査した。これまでの調査により、TCs 薬剤の使用が KM および TMP に対する耐性を選択していることが示唆されている [8]。今回の調査では、TCs 薬剤暴露群で、ABPC および DSM に対する耐性率の上昇が認められており、また、OTC-ABPC 耐性および OTC-DSM 耐性の共耐性を示す株の比率が、非暴露群に比べて、TCs 薬剤暴露群で上昇していたことから (表 7)、ABPC および DSM に対する耐性も TCs 薬剤使用により共選択されている可能性が示唆された。同様に、PS 配合剤暴露群において、OTC および KM に対する耐性率が上昇しており、これらの耐性を含む共耐性 (ABPC-OTC、DSM-OTC、ABPC-KM、DSM-KM 耐性) を示す株の比率の上昇も認められたことから、PS 配合剤使用による OTC および KM 耐性の共選択が示唆された。

一方で、PCs 薬剤暴露群において ABPC-OTC 耐性、また、ST 合剤暴露群において TMP-OTC および TMP-KM 耐性の共耐性が高比率に認められたものの、これらの暴露群における OTC や

表6 各種抗菌薬が使用されていた豚由来大腸菌の薬剤耐性率

抗菌薬暴露状況	耐性率およびリスク比 (95% 信頼限界)				
	ABPC	DSM	OTC	KM	TMP
TCs 薬剤 (n=66)	36.4% 1.66* (1.14-2.41)	69.7% 1.58* (1.30-1.93)	83.3% 1.38* (1.20-1.58)	24.2% 1.69* (1.03-2.78)	34.8% 1.61* (1.10-2.37)
PCs 薬剤 (n=34)	38.2% 1.75* (1.09-2.79)	58.8% 1.33 (0.98-1.81)	73.5% 1.22 (0.98-1.51)	14.7% 1.03 (0.44-2.40)	38.2% 1.77* (1.10-2.83)
ST 合剤 (n=33)	27.3% 1.25 (0.69-2.25)	42.4% 0.96 (0.64-1.46)	69.7% 1.15 (0.91-1.47)	21.2% 1.48 (0.73-3.00)	45.5% 2.10* (1.38-3.21)
PS 配合剤 (n=22)	50.0% 2.28* (1.44-3.62)	77.3% 1.75* (1.36-2.26)	77.3% 1.28* (1.01-1.63)	31.8% 2.22* (1.15-4.31)	22.7% 1.05 (0.47-2.33)
非暴露 (n=356)	21.9%	44.1%	60.4%	14.3%	21.6%

*非暴露群との比較により、有意 (95% 信頼限界の下端が1を越えたものを有意と判定) に高いリスク比を示す
リスク比 = 暴露群における耐性率 / 非暴露群における耐性率

表7 各薬剤暴露群と非暴露群における共耐性を示す株の分布状況

抗菌薬暴露状況	共耐性を示す株数 (%)			
	ABPC-DSM	ABPC-OTC	ABPC-KM	ABPC-TMP
PCs 薬剤 (n = 34)	11 (32.4)	12 (35.3) *	2 (5.9)	5 (14.7)
非暴露 (n = 356)	69 (19.4)	65 (18.3)	20 (5.6)	38 (10.7)

抗菌薬暴露状況	共耐性を示す株数 (%)			
	OTC-ABPC	OTC-DSM	OTC-KM	OTC-TMP
TCs 薬剤 (n = 66)	24 (36.4) **	42 (63.6) **	16 (24.2) *	22 (33.3) **
非暴露 (n = 356)	65 (18.3)	120 (33.7)	42 (11.8)	63 (17.7)

抗菌薬暴露状況	共耐性を示す株数 (%)			
	TMP-ABPC	TMP-DSM	TMP-OTC	TMP-KM
ST 合剤 (n=33)	6 (18.2)	9 (27.3)	14 (42.4) **	7 (21.2) *
非暴露 (n=356)	38 (10.7)	53 (14.9)	63 (17.7)	26 (7.3)

抗菌薬暴露状況	共耐性を示す株数 (%)					
	ABPC-OTC	DSM-OTC	ABPC-KM	DSM-KM	ABPC-TMP	DSM-TMP
PS 配合剤 (n=22)	10 (45.5) **	16 (72.7) **	5 (22.7) *	6 (27.3) *	4 (18.2)	4 (18.2)
非暴露 (n=356)	65 (18.3)	120 (33.7)	20 (5.6)	40 (11.2)	38 (10.7)	53 (14.9)

*, ** 非暴露群に比べて有意に高い比率を示す (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

KM に対する耐性率の上昇は認められなかった。共選択は、使用薬剤に対する耐性が選択されることにより引き起こされる [4]。今回、PCs 薬剤又は ST 合剤の暴露群では、使用された薬剤と同系統の ABPC や TMP に対する耐性率が 50% 以下と比較的低く、このことが共選択の影響を制限している可能性がある。

以上のことから、抗菌薬の使用は、交差耐性および共耐性の発現を介して、農場レベルの薬剤耐性菌の分布に影響を及ぼしていることが明らかとなった。また、共選択の影響の範囲および程度は、使用される薬剤によって異なっていることが示唆された。

5. おわりに

従来から、動物用抗菌薬の使用による選択圧は、薬剤耐性菌の発現および分布に影響を及ぼす重要な要素と認識されている。特に、今回の成績は、抗菌薬使用による交差耐性および共耐性の発現が薬剤耐性菌の分布に与える影響について特徴づけ

ている。

病原性大腸菌の薬剤感受性には、第一次選択薬の使用による交差耐性の影響が強く反映されていた。また、インテグロンなどの耐性機構に起因する共耐性が、CP 耐性大腸菌の維持に関与していることが示唆された。このことから、特定の薬剤耐性の発現・維持には、複数種の抗菌薬の使用による選択圧が関与していると考えられる。さらに、抗菌薬暴露を受けた豚由来の指標大腸菌の薬剤感受性から、農場レベルにおいて抗菌薬使用による交差耐性の影響が大きいことが明らかとなった。また、使用薬剤の系統ごとに異なる程度で共選択が生じている可能性も示唆され、特定の薬剤の使用は複数種の耐性の選択に関与していると考えられる。

一方で、これまでの国内での調査結果から、抗菌薬による選択圧のない状況下においても、特定の伝達性耐性因子の分布 [13]、細菌の定着性 [3]、野生動物などによる農場への導入 [10] により、耐性菌が発現・維持されている可能性が示唆されている。また、海外の調査結果から、飼育環境や

宿主の年齢 [14, 15] も、耐性分布に影響を及ぼす因子として考えられる。

動物用抗菌薬のリスク評価および薬剤耐性菌のリスク管理は、可能な限り実態に近いデータに基づいて実施されることが望ましく、今後、交差耐性および共耐性を含めた耐性分布に影響を及ぼす因子についてあらゆる角度からの解析が望まれる。

6. 謝 辞

供試菌株の収集などにご協力いただいた各都道府県の家畜保健衛生所などの職員各位に深謝します。

要 約

病畜の牛および豚から分離された大腸菌の薬剤感受性について調査したところ、現在使用されていないものを含む対象としたほぼ全ての薬剤に対する耐性率が、健康畜に比べて高かった。従って、病畜に対する抗菌薬の使用による選択圧は、頻繁に使用される薬剤に対する交差耐性のみではなく、その他の薬剤に対する耐性の発現にも関与していることが示唆された。

次に、食用動物における CP 使用中止後の CP 耐性大腸菌の維持と共耐性の関連性について調査した。牛由来の CP 耐性遺伝子保有株は ABPC, DSM, OTC および TMP に対する耐性を、豚由来の CP 耐性遺伝子保有株は DSM および TMP に対する耐性をそれぞれ高率に示した。また、AGs 薬剤又は TMP (および OMP) に対する耐性因子を保有するクラス 1 インテグロンが、CP 耐性遺伝子保有株に多く分布していた。従って、CP 以外の薬剤の使用が CP 耐性大腸菌の共選択に寄与していると考えられる。

また、農場における抗菌薬の使用歴に基づき、異なる薬剤に暴露された豚由来の薬剤耐性大腸菌の分布状況について調査した。抗菌薬が使用されていなかった群に比べて、ABPC 耐性は PCs 薬剤および PS 配合剤が使用されていた群で、DSM 耐性は PS 配合剤が使用されていた群で、TMP

耐性は ST 合剤が使用されていた群でそれぞれ多く認められた。また、ABPC 耐性および DSM 耐性は TCs 薬剤が使用されていた群でも、TMP 耐性は PCs 薬剤が使用されていた群でも、また、OTC 耐性および KM 耐性は、PS 配合剤が使用されていた群でもそれぞれ多く認められた。従って、抗菌薬の使用は、農場レベルの交差耐性および共耐性の発現に関与していることが示唆された。

これらの所見は、薬剤耐性菌のリスク分析において、交差耐性や共耐性による影響を考慮する必要性を提起している。

参考文献

- 1) 浅井鉄夫：JVARMにおける抗菌剤の使用と耐性との関係解析について。動物抗菌会報, 27, 10-16 (2005)
- 2) Asai T, Kojima A, Harada K, et al. : Correlation between the usage volume of veterinary therapeutic antimicrobials and resistance in *Escherichia coli* isolated from the feces of food-producing animals in Japan. Jpn J Infect Dis, 58, 369-372 (2005)
- 3) Asai T, Ishihara K, Harada K, et al. : Long-term prevalence of antimicrobial-resistant *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serovar Infantis in the broiler chicken industry in Japan. Microbiol Immunol, 51, 111-115 (2007)
- 4) Catry B, Laevens H, Devriese LA, et al. : Antimicrobial resistance in livestock. J Vet Pharmacol Ther, 26, 81-93 (2003)
- 5) Fluit AC, Visser MR, Schmitz FJ. : Molecular detection of antimicrobial resistance. Clin Microbiol Rev, 14, 836-871 (2001)
- 6) Harada K, Asai T, Kojima A, et al. : Antimicrobial susceptibility of pathogenic *E. coli* isolated from sick cattle and pigs in Japan. J Vet Med Sci, 67, 999-1002 (2005)
- 7) Harada K, Asai T, Kojima A, et al. : Role of co-resistance in the development of resistance to chloramphenicol in *Escherichia coli* isolated from sick cattle and pigs. Am J Vet Res, 67, 230-235 (2006)
- 8) Harada K, Asai T, Kojima A, et al. : Contribution

- of multi-antimicrobial resistance to the population of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from apparently healthy pigs in Japan. Microbiol Immunol, 51, 493-499 (2007)
- 9) Harada K, Asai T, Ozawa M, et al. : Farm-level impact of therapeutic antimicrobial use on antimicrobial-resistant populations of *Escherichia coli* isolates from pigs. Microb Drug Resist, 14, 239-244 (2008)
- 10) Ishihara K, Yano S, Nishimura M, et al. : The dynamics of antimicrobial-resistant *Campylobacter jejuni* on Japanese broiler farms. J Vet Med Sci, 68, 515-518 (2006)
- 11) 石丸雅敏, 遠藤裕子, 吉村治郎 : 1992～1994年に家畜家禽から分離された大腸菌, サルモネラ及び黄色ブドウ球菌の各種抗菌剤に対する薬剤耐性. 動薬検年報, 33, 1-20 (1996)
- 12) Kijima-Tanaka M, Ishihara K, Morioka A, et al. : A national surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Japan. J Antimicrob Chemother, 51, 447-451 (2003)
- 13) Kojima A, Ishii Y, Ishihara K, et al. : Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* strains isolated from farm animals from 1999 to 2002: report from the Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring Program. Antimicrob Agents Chemother, 49, 3533-3537 (2005)
- 14) Langlois BE, Dawson KA, Leak I, et al. : Effect of age and housing location on antibiotic resistance of fecal coliforms from pigs in a non-antibiotic-exposed herd. Appl Environ Microbiol, 54, 1341-1344 (1988)
- 15) Mathew AG, Saxton AM, Upchurch WG, et al. : Multiple antibiotic resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from swine farms. Appl Environ Microbiol, 65, 2770-2772 (1999)
- 16) 中澤宗生 : 大腸菌症, 豚病学, 柏崎守ら編集, 第4版, 328-335, 近代出版, 東京 (1999)
- 17) 社団法人 日本動物用医薬品協会 : 各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量 平成15年 (2003)
- 18) Tamura Y : The Japanese veterinary antimicrobial resistance monitoring system (JVARM). OIE international standards on antimicrobial resistance. 206-210 (2003)
- 19) 田村豊 : 動物用抗菌剤の使用動向と薬剤耐性菌対策-特に臨床獣医師の果たす役割について. 日獣会誌, 56, 685-691 (2003)
- 20) Yunis AA : Chloramphenicol toxicity: 25 years of research. Am J Med, 87, 44N-48N (1989)

Farm-Level Development of Cross-Resistance and Co-Resistance in *Escherichia coli* Obtained from Food-Producing Animals Associated with the Use of Veterinary Drugs

Kazuki HARADA

*National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
1-15-1 Tokura, Kokubunji, Tokyo 185-8511, Japan*

Firstly, the antimicrobial susceptibilities in *Escherichia coli* isolates from sick cattle and pigs were examined. Resistance rates to almost all the antimicrobials, including antimicrobials that are currently disused for food-producing animals, were higher in sick animals than apparently healthy animals. Thus, therapeutic use of antimicrobials for diseased animals is likely to greatly contribute to the development of not only cross-resistance to frequent used drugs but also the resistances to other antimicrobials in *E. coli*.

Next, the association between co-resistance and the persistent resistance to chloramphenicol (CP) in *E. coli* isolated from food-producing animals after the ban of its use was investigated. Strains with the CP resistance genes isolated from cattle, were often resistant to ampicillin (ABPC), dihydrostreptomycin (DSM), oxytetracycline (OTC) and trimethoprim (TMP), and those isolated from pigs were often resistant to DSM and TMP. Class 1 integrons, including gene cassettes responsible for resistance(s) to streptomycins, methoprim, or both, were more prevalent in strains with the CP resistance genes. Therefore, selective pressure imposed by the use of antimicrobials other than CP in cattle and pigs may contribute to the co-selection of chloramphenicol-resistant *E. coli*.

Finally, the populations of antimicrobial-resistant *E. coli* isolated from pigs exposed to different antimicrobial drugs were investigated, based on histories of antimicrobial use on each farm. A comparative analysis with the non-exposed herd revealed that ABPC resistance increased in the herds exposed to penicillin and penicillin-streptomycin; DSM resistance, in the penicillin-streptomycin-exposed herd; and TMP resistance, in the methoprim-sulfonamide-exposed herd. On the other hand, ABPC and DSM resistances increased in the tetracycline-exposed herd; TMP resistance, in the penicillin-exposed herd; and OTC and KM resistances, in the penicillin-streptomycin-exposed herd. Thus, the therapeutic use of the antimicrobials studied, contributed to the farm-level development of cross-resistance and co-resistance in *E. coli*.

These findings would raise the necessity to take into account the influence of cross-resistance and co-resistance in the risk analysis of antimicrobial-resistant bacteria in food-producing animals.