

総説

仔ウシ由来大腸菌のフルオロキノロン剤耐性獲得状況

村田 亮

酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医細菌学ユニット

〒069-8501 北海道 江別市 文京台緑町 582 番地

Tel/Fax : 011-388-4899

E-mail : ryomurata@rakuno.ac.jp

【要約】

現在、畜産現場ではフルオロキノロン系抗菌剤が多用されているが、近年これらに対する耐性菌の出現が問題となっている。仔ウシ由来大腸菌を用いてエンロフロキサシンに対する耐性保有状況を調査し、畜産現場におけるフルオロキノロン剤の使用方法について検討することを目的とし、実験を行ったところ、SN ディスク (OFLX、CP、OTC、ABPC、CEZ) による薬剤感受性試験によって高い耐性率が示された。さらに MIC 値の測定およびキノロン耐性領域のアミノ酸変異においてもエンロフロキサシンの高度耐性がみとめられた。この結果はこれまでの全国平均と比較しても著しく高いことから、農場によっては薬剤の使用方法に抜本的な見直しが必要とされることが明らかとなった。

キーワード: 大腸菌、ウシ、キノロン剤

【緒論】

“下痢症”はウシに最も多く発生する疾病の一つであり、新生仔ウシを死に至らしめる主な原因となっている [1]。しかしその対応は各農場、その規模によって大きく異なっている。例えば、小規模農場においてはしばしば対策マニュアル自体が存在せず、経験に基づいた独自の治療によって本病を一時的に回避しているのが現況である。逆に、大規模農場では本来二次選択薬としての使用が推奨されているキノロン系抗菌剤を予防的に投与している実態がある。

抗菌剤は家畜の細菌性感染症の治療に非常に重要な役割を果たしているものの、その多用によるリスクにも注意を払わねばならない。特にフルオロキノロン系を主成分とする注射液の乱用は、耐性菌出現の観点から世界的にも危険視されており、2005年の米国食品医薬品庁によ

る「家禽への使用承認取り消し」にまで発展した [8]。これに関連して、日本でも家畜由来細菌株に対する薬剤感受性調査が毎年実施されているが、現在までのところフルオロキノロン系抗菌剤に対する感受性は高い傾向にあると考えられている [5]。しかし一方で、本国においても鶏肉から分離されたカンピロバクター株の約半数がフルオロキノロン系抗菌剤に耐性を示すという調査があり、また、キノロン耐性の獲得が遺伝子学的に証明された菌種も増加傾向にある [4]。

今回、家禽と比較して耐性菌保有状況についての報告が少ないウシ由来の大腸菌株について薬剤感受性試験を実施した。仔ウシは様々な病原体に対して免疫が不完全であり、抗菌剤を用いる機会が多い。中でも肉用牛が耐性菌を保有することはヒト疾病につながる危険性があると考えられることから、交雑 (F1) 個体の糞便由来大腸菌株について調査を実施した。

受理：2015年11月2日

【材料と方法】

2011年～2013年にかけて大規模酪農場の仔ウシ（F1、2週齢前後）83頭の直腸便から分離した大腸菌174株を用いて以下の試験を実施した。

ディスク拡散法による薬剤感受性試験：0.85%滅菌生理食塩水に、Trypticase Soy Agar（Becton, Dickinson and Company）上の新鮮培養コロニーを懸濁してMcFarland No. 0.5の菌浮遊液を用意した。この100 μ LをMuller Hinton II Agar（Becton, Dickinson and Company）平板培地に均一に塗抹した後、SNディスク（日水製薬株式会社）を軽く押し当て接着した。これを37 $^{\circ}$ Cで24時間培養し、発育阻止円の直径から各薬剤に対する感受性の程度を感性（S）、中間（I）、耐性（R）に鑑別した。SNディスクはオフロキサシン（OFLX）、クロラムフェニコール（CP）、セファゾリン（CEZ）、オキシテトラサイクリン（OTC）、アンピシリン（ABPC）を使用した。

最小発育阻止濃度（MIC）の測定：エンロフロキサシン（SIGMA-ALDRICH）を終濃度128～0.0625 μ g/mLとなるようにMuller Hinton II Agarに混和し、各濃度の平板培地を作成した。大腸菌株は0.85%滅菌生理食塩水を用いてMcFarland No. 0.05に調整、マイクロプランターを用いて接種し、37 $^{\circ}$ Cで24時間培養した。発育が確認できた希釈列のうち最も低い薬剤濃度より一つ濃い濃度をMICとした。

キノロン耐性決定領域（QRDR）の塩基配列解析：ディスク拡散法でOFLXを含む5剤、4剤に耐性を示した菌株をそれぞれ5株ずつ、3剤耐性のものを2株、OFLXに感受性を示した5株、合計17株について、Genとるくん酵母用（TaKaRa）を用いてDNA抽出を行った。*gyrA* 遺伝子の増幅及びシーケンス解析にはプライマー STGYRA1

(5'-TGTCCGAGATGGCCTGAAGC-3')

およびSTGYRA12

(5'-CGTTGATGACTTCCGTCAG-3')

を[2]、PCR反応にはKAPA Taq Extra DNA Polymerase（KAPA BIOSYSTEMS）を用いた。反応条件は94 $^{\circ}$ C 3分に続けて94 $^{\circ}$ C 1分、55 $^{\circ}$ C 1分、72 $^{\circ}$ C 1分を30サイクル、これに最

終回は72 $^{\circ}$ C 10分を追加した。*gyrA* 遺伝子塩基配列およびアミノ酸配列解析にはBioEdit version 7.2.5を使用した。

血清型別：病原大腸菌免疫血清（デンカ生研株式会社）の混合免疫血清および単味血清を用いてO群血清型別を行った。

毒素遺伝子の検出：PCR法によってエンテロトキシン遺伝子（*LT1*、*ST1*、*ST2*）および志賀毒素関連遺伝子（*Stx1*、*Stx2*、*eae*）の検出を試みた[7, 6]。

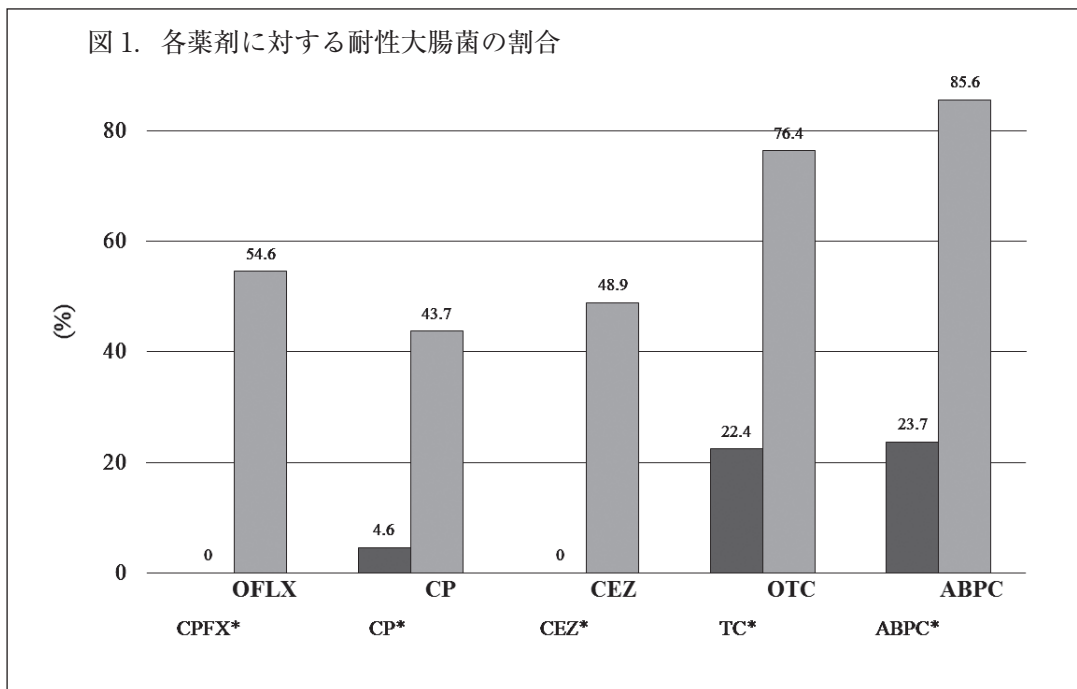
【結果】

薬剤感受性試験：薬剤別の耐性率はそれぞれOFLXで54.6%、CP 43.7%、CEZ 48.9%、OTC 76.4%、ABPC 85.6%であった（図1）。耐性を示した薬剤数（OFLXを含む）の割合は1剤（OFLXのみ）および2剤が0%、3剤が34.7%、4剤が38.9%、5剤が26.3%となった（図2）。

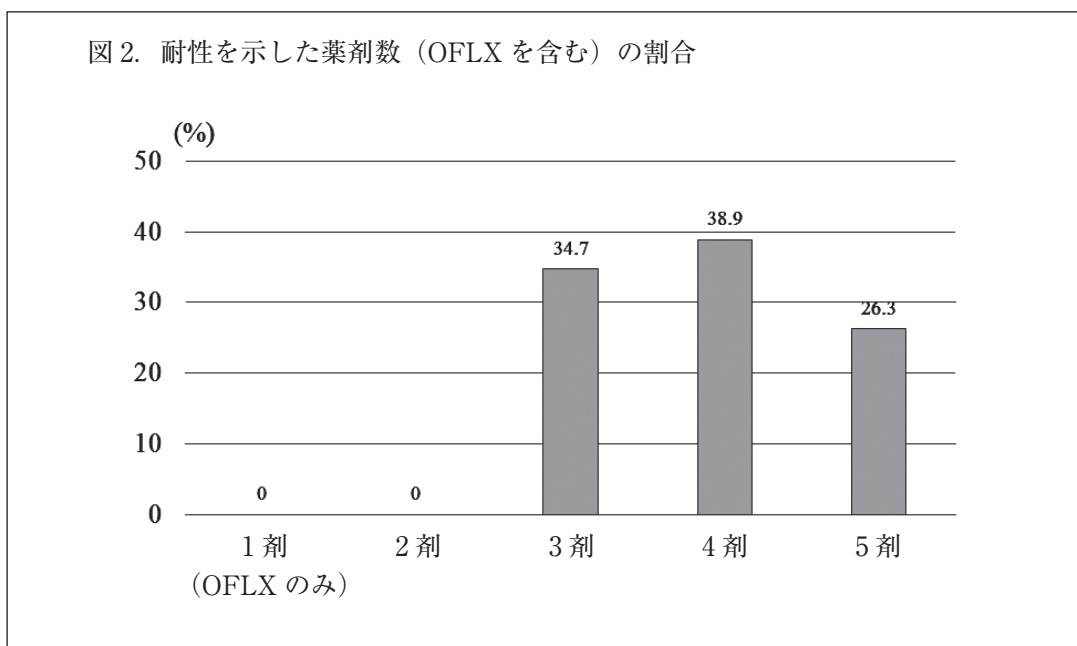
MIC：ディスク拡散法によりOFLX耐性と判定された大腸菌株について、エンロフロキサシンのMICを測定したところ、78.6%が>128 μ g/mLであり、最もMICが小さい株は4 μ g/mLであった。一方、OFLXディスクで感性和判定された菌株のエンロフロキサシンMICはいずれも2.0～0.25 μ g/mLに位置していた（図3）。

QRDRアミノ酸変異：ディスク拡散法で3～5剤の多剤耐性を示した菌株、12株全てにおいて、2箇所のアミノ酸変異すなわちQRDR 83番目のアミノ酸残基SがLへ、87番目DがNへの変異が確認された。また、フルオロキノロン剤感受性の5菌株全てにおいて、アミノ酸変異は確認されなかった。大腸菌における*gyrA*のキノロン耐性に関連するアミノ酸変異は6箇所報告があるが、その他の4箇所：67A、81G、84A、106Qについて変異は認められなかった（表1）。

血清型および毒素遺伝子保有状況：大腸菌のO群血清型別を行ったところ、O-18が最も多く22株（12.6%）、次いでO-8が10株（5.6%）、その他O-1、25、116、142、153、116が含まれていたが各薬剤に対する感受性に相関は認められなかった。O-18に*Stx1*遺伝子を保有するものが1株のみ見付かった（図4）。



* 平成 25 年度家畜由来細菌の抗菌性物質感受性実態調査結果（動物医薬品検査所）より、ウシ由来大腸菌の薬剤感受性試験結果



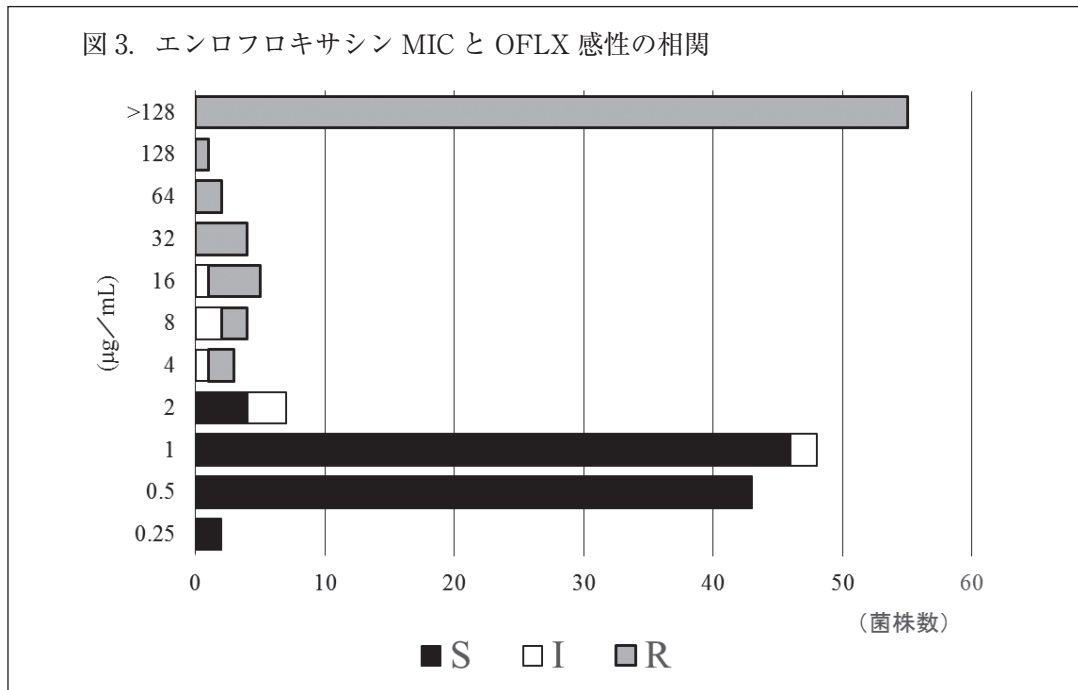
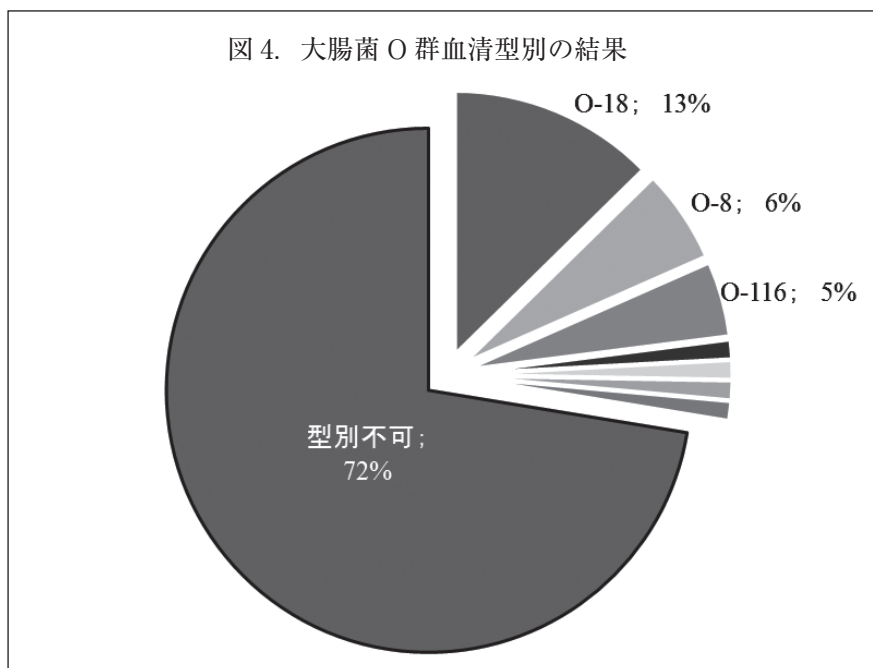


表1. QNDR のアミノ酸変異

耐性薬剤数 (感性薬剤)	エンロフロキサシン MIC (µg/mL)	GyrA アミノ酸残基					
		67	81	83	84	87	106
5	>128	A	G	L	A	N	Q
5	>128	A	G	L	A	N	Q
5	>128	A	G	L	A	N	Q
5	>128	A	G	L	A	N	Q
5	>128	A	G	L	A	N	Q
4 (CP)	>128	A	G	L	A	N	Q
4 (CP)	32	A	G	L	A	N	Q
4 (CEZ)	>128	A	G	L	A	N	Q
4 (CEZ)	16	A	G	L	A	N	Q
4 (OTC)	>128	A	G	L	A	N	Q
3 (CP, CEZ)	>128	A	G	L	A	N	Q
3 (CEZ, ABPC)	32	A	G	L	A	N	Q
1 (OFLX)	1	A	G	S	A	D	Q
2 (OFLX, CP)	1	A	G	S	A	D	Q
2 (OFLX, CEZ)	1	A	G	S	A	D	Q
4 (OFLX, CP, OTC, ABPC)	0.5	A	G	S	A	D	Q
4 (OFLX, CP, CEZ, ABPC)	0.5	A	G	S	A	D	Q



[考察]

ディスク拡散法による薬剤感受性試験では、薬剤によって差はあるものの、いずれも動物医薬品検査所による家畜由来細菌の薬剤耐性モニタリング結果に比較して著しく高い耐性率を示した。これは、当該大規模酪農場における抗菌剤の使用法に何らかの要因があるものと考えられる。また、OFLX を含む耐性薬剤数ごとの割合から、キノロン系薬剤に耐性をもつ大腸菌株の多くは多剤耐性傾向を示していることが分かる。ヒト由来フルオロキノロン耐性大腸菌においても同様に多剤耐性傾向を示すとの調査報告があり [3]、このような菌株がウシおよびヒト疾病の原因となった場合、抗菌剤による治療が非常に困難になると予想される。ただし、今回使用した仔ウシ由来大腸菌株の中には、動物およびヒトに対して病原性が高いと断定できるような血清学的、遺伝子学的証拠は見いだせなかった。

エンロフロキサシン MIC においても、ディスク法によって OFLX を含む多剤耐性菌と判定した菌株の多くが $> 128\mu\text{g/mL}$ であった。

OFLX 耐性株と感性株では、MIC が重複することがなく、薬剤感受性ディスクの成績と MIC との相関性が高いことが示唆された。一般的に、ディスク拡散法は細菌株の耐性獲得状況を考察するためにはやや不正確な方法と考え

られている。本研究では、生産現場でも簡便に実施することが可能なディスク法によってまず各薬剤の感性状況を調べたが、次に行ったエンロフロキサシン MIC との相関性が高かったことから、当該農場の耐性蓄積状況が一般的な農場よりも高いことは確からしい。今後現場での抗菌剤使用方法を検討するにおいて、ディスク法が十分に活用可能であることも明らかとなった。

gyrA 遺伝子配列の解析において、大腸菌におけるキノロン耐性との関連性が明らかとなっている QRDR アミノ酸 6 箇所のうち 2 箇所での変異がみられたところから、少なくとも第一段階の耐性獲得が生じていることがわかる。多剤耐性菌株の中にはさらに *parC* すなわち第二、第三段階のアミノ酸変異が蓄積されているものが存在すると考えられる。今後は *parC* 遺伝子および *parE* 遺伝子配列の解析を行うことで獲得段階を明らかにし、当該農場における抗菌剤使用方法との因果関係を解明する必要があるだろう。このように、全国的なサーベイにおいては低いと考えられている家畜由来細菌株の薬剤耐性率も、高度耐性化を阻止するためには農場別の精査が必要であることが明らかとなった。特に、畜産現場においてキノロン系薬剤の適切な使用方法について早急な対応が必要であると思われる。

[引用文献]

- [1] Bendali, F., Bichet, H., Schelcher, F. and Sanaa, M. 1999. Pattern of diarrhoea in newborn beef calves in south-west France. *Vet. Res.* 30: 61-74.
- [2] Giraud, E., Brisabois, A., Martel, J. L. and Chaslus-Dancla, E. 1999. 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.
- [3] 石畝 史、東方美保、山崎 貢、松雪星子、森屋一雄、田中大祐、磯部順子、京田芳人、村岡道夫. 2006. 散発下痢症患者由来のフルオロキノロン耐性大腸菌における *gyrA* 遺伝子および *parC* 遺伝子の変異. *感染症学雑誌*. 80 (5): 507-512.
- [4] Igimi, S., Okada, Y., Ishiwa, A., Yamasaki, M., Morisaki, N., Kubo, Y., Asakura, H. and Yamamoto, S. 2008. Antimicrobial resistance of *Campylobacter*: prevalence and trends in Japan. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 25: 1080-1083.
- [5] 小島明美. 2004. 国内における家畜由来細菌の抗菌性物質感受性調査. *月刊養豚情報*. 32 (4): 23-29.
- [6] 又吉正直、貝賀眞俊、大城 聡、中澤宗生. 2001. 沖縄県で分離された子豚下痢由来腸管毒素原性大腸菌 (ETEC) の細菌学的性状と病原遺伝子保有状況. *日本獣医師会雑誌* 54 (8): 595-600.
- [7] Meng, J., Zhao, S., Doyle, M. P., Mitchell, S. E. and Kresovich, S. 1997. A multiplex PCR for identifying Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 172-176.
- [8] Nelson, J. M., Chiller, T. M., Powers, J. H. and Angulo, F. J. 2007. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* species and the withdrawal of fluoroquinolones from use in poultry: a public health success story. *Clin. Infect. Dis.* 44: 977-980.

Prevalence of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* from calves

Ryo Murata

Laboratory of Veterinary bacteriology, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University
Ebetsu, Hokkaido, 069-8501, Japan
Tel : 81-11-388-4899
E-mail : ryomurata@rakuno.ac.jp

[Abstract]

Currently, in the livestock field fluoroquinolone antibacterial agents have been widely used. However, these drugs have produced resistant bacteria. We investigated the prevalence of resistant bacteria against enrofloxacin using *Escherichia coli* derived from calves. By the paper disk method (OFLX, CP, OTC, ABPC, CEZ), it has become clear that these *E. coli* have a high resistance range. In addition, measurement of MIC and amino acid mutations in the quinolone resistance determining region (QRDR) values enrofloxacin high-level resistance was observed. These results are significantly higher even in comparison with the national average so far. This study has revealed that some farmers, there is a need to improve the use of medicines.

Key words: bovine, *E. coli*, Quinolone