

異なる成長ステージの肥育牛から単離された大腸菌の薬剤耐性

山形大学農学部 非会員 ○横山 律
山形大学農学部 正会員 西山 正晃
山形大学農学部 非会員 松山 裕城
山形大学農学部 正会員 渡部 徹

1. はじめに

薬剤耐性菌とは抗菌薬に耐性を獲得した細菌の総称であり、抗菌薬が投与されるヒトや家畜の体内で主に発生する。薬剤耐性菌による感染症は臨床現場でしばしばアウトブレイクとして発生し、治療に有効な抗菌薬が制限されることから、公衆衛生上の大きな問題となっている¹⁾。畜産施設では、病畜の治療だけでなく、健康家畜の感染予防ならびに成長促進を目的として抗菌薬が日常的に使用されており、日本国内における抗菌薬使用の約半分近くが畜産分野で使用されている¹⁾。日本では動物由来薬剤耐性菌モニタリング (Japanese Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring : JVARM) によると、健康な肥育牛における耐性菌の検出率は0~22.5%であり、抗菌薬使用量が増加するに伴い、耐性菌の検出率が高くなる²⁾。

畜産施設は薬剤耐性菌発生ホットスポットとして認識されており³⁾、畜産施設での耐性菌の調査は多いが、異なる成長ステージ（親と子供）の肥育牛における耐性菌の発生動向を調査した事例はおそらくない。本研究では、同一の畜産施設で飼育する肥育牛を対象に薬剤耐性菌のモニタリングを行い、その発生源と伝播経路について考察した。

2. 方法

2.1 サンプルング

調査は山形大学付属農場で飼育している肥育牛を対象にして行った。2022年1~12月にかけて毎月1回の頻度で、健康な肥育牛の親子6ペア（親：月齢11ヶ月以上、子供：10ヶ月齢未満）の各個体からふん便を採取した。採取したふん便はクーラーボックスに入れ、6時間以内に細菌の分析を行った。

2.2 細菌の計数と大腸菌株の単離

細菌の計数には、大腸菌検出用として Chromocult[®] Coliform (Merck)、耐性菌検出用として CHROMagar[™] ESBL、CHROMagar[™] VRE、および CHROMagar[™] CARBA (関東化学) を使用した。1g のふん便試料を9mL の生理食塩水で適宜希釈した後、希釈したサンプル 100 μ L を各種選択培地の上にコンラージ棒で塗布した。37 $^{\circ}$ Cで24時間培養した後、各選択培地上に形成した大腸菌の陽性コロニーを計数した。計数後、Chromocult[®] Coliform の培地上で大腸菌陽性となったコロニーを最大10個釣菌し、Luria-Bertani (LB, BD) 培地に単離した。単離した菌株について以下の実験を行った。

2.3 大腸菌の同定と薬剤感受性試験

大腸菌の同定のため、PCR法によって大腸菌の特異遺伝子である *uidA* の検出を行った。単離した大腸菌株から Insta Gene Matrix (Bio-rad) を用いて、付属の使用説明書に従ってDNAを抽出した。大腸菌と同定された菌株について、Kirby-Bauer法による薬剤感受性試験を行った。抗菌薬には18薬剤 (ABPC、CTX、CAZ、CPX、CXM、CFX、IPM、AZT、ACV、T/P、ST、GM、AMK、CIP、TC、TGC、FOM、CP) を選定し、各抗菌薬に対する薬剤感受性を CLSI の基準に準じて判定した。

2.4 耐性遺伝子の検出

薬剤感受性試験の結果、抗菌薬に耐性を示した菌株について薬剤耐性遺伝子の検出を行った。アンピシリ

キーワード：薬剤耐性菌、大腸菌、ふん便、肥育牛

住所：〒997-8555 山形県鶴岡市若葉町1-23, Tel: 0235-28-2907, E-mail: to-ru@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp

ンとテトラサイクリンに耐性を示す菌株が確認されたため、両抗菌薬に関連する耐性遺伝子であるβラクタマーゼ (*bla*_{CTX-M group 1}, *bla*_{CTX-M group 2}, *bla*_{CTX-M group 8}, *bla*_{CTX-M group 9}, *bla*_{TEM}) とテトラサイクリン耐性遺伝子 (*tetA*, *tetB*, *tetC*, *tetD*, *tetE*, *tetJ*, *tetG*, *tetL*, *tetM*, *tetW*, *tetX*) の検出をPCR法にて実施した。

2.5 分子疫学解析

Multi-Locus Sequence Typing (MLST) によって、ふん便から分離された薬剤耐性菌の発生源と伝播経路の調査を行った。MLSTでは、薬剤耐性株に存在する7つのハウスキーピング遺伝子 (*adh*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) をPCRで遺伝子増幅をし、ExoSAP (Applied Biosystems) 処理の後、その遺伝子配列を株式会社ファスマックに委託して解析した。得られた配列情報をもとに、PubMLST (<https://pubmlst.org/>) データベースを用いてST型を決定した。

3. 結果と考察

1年間のモニタリングの結果、耐性菌検出用の培地からどの個体からも耐性菌は一度も検出されなかった。図1に、月別のふん便試料から検出された大腸菌数を示す。年間を通して、親個体からは大腸菌の検出頻度が低かった (n=6, 15%) のに対して、生後10ヶ月未満の子の個体からは頻りに検出された (n=36, 94%)。肥育牛の親と子の個体では与えている飼料が異なり、それに伴った腸内環境の相違がこの結果をもたらしているのかもしれない。

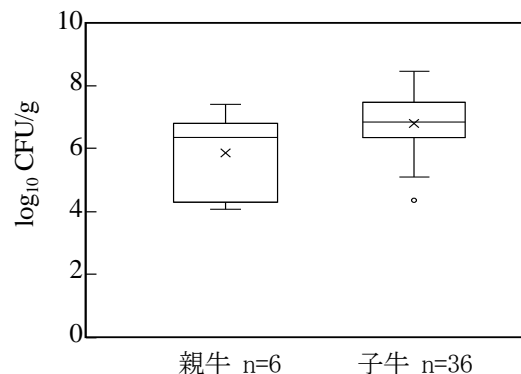


図1 肥育牛のふん便中の大腸菌数 (nは陽性検体数)

表1 薬剤耐性菌の検出結果

個体名	分離株数	耐性株数	耐性を示した抗菌薬名	耐性遺伝子の型別	ST型
親	P1	N.D.			
	P2	2			
	P3	10			
	P4	1			
	P5	2			
	P6	16			
子	P1-C	20			
	P2-C	23	1	ABPC	<i>bla</i> _{TEM} ST8355
	P3-C	70			
	P4-C	80			
	P5-C	70			
	P6-C	90	1	TC	<i>tetB</i> 該当なし
合計	384	2			

調査期間を通じて384株の大腸菌

株を単離し、薬剤感受性試験を行ったところ、個体P2-C (月齢8ヶ月) よりABPC耐性、個体P6-C (月齢4ヶ月) よりTC耐性を示した大腸菌株が確認された。対象農場における薬剤耐性大腸菌の割合は0.52% (2株/384株) であり、国内の健康な家畜を対象としたそれぞれの耐性率 (ABPC: 6.3%、TC: 22.5%) と比較して非常に低かった。調査対象の農場では、月齢5ヶ月の去勢時にABPCが使用されたのみで、抗菌薬の使用履歴はほとんどない。このことから、抗菌薬の使用頻度と量が少ない農場では薬剤耐性菌は発生しないと考えられる。

両耐性大腸菌株について耐性遺伝子の検出を行った結果、ABPC耐性株は*bla*_{TEM}を、TC耐性の菌株は*tetB*を保有していた。この2株は別々の個体から分離されており、親子間での耐性菌の伝播でも無かった。両菌株についてMLST解析を行ったところ、ABPC耐性株はST8355と同定された。このST型は、イギリスの牛の腸管内から分離されたShiga toxin-producing *E. coli* (STEC) として報告がされており、牛に関連の深い菌株であると推察される。他方、TC耐性株ではデータベースに報告されているどのST型にも該当しなかった。

以上をまとめると、大腸菌は親牛と比較して子牛で頻りに検出されるものの、この成長ステージでは抗菌薬の使用の経験が少ないため、薬剤耐性菌の発生にはつながっていなかった。

参考文献

- 1) Markus *et al.*, *EMBO Reports*, **21**, 2020 ; 2) 薬剤耐性ワンヘルス動向調査検討会, 薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告書 2021 ; 3) Amore *et al.*, *EFSA Supporting Publications*, **17**, 2020