

1 牛乳房炎由来レンサ球菌の薬剤感受性と耐性遺伝子保有状況調査

県中央家畜保健衛生所

加藤貴誉湖、小池新平

はじめに

乳房炎由来のレンサ球菌は、伝染性乳房炎の原因菌である無乳性レンサ球菌*Streptococcus agalactiae* (SAG) や環境性乳房炎の原因菌である環境性レンサ球菌 (OS) が知られている。本県の乳汁検査において、牛乳房炎由来の乳汁からは、多数のレンサ球菌が分離されているが、農場に対し迅速な検査結果の回答のため、分離菌の詳細な菌種同定は行わず、その多くはOSとして扱われ、その実態は把握されていない。

環境性レンサ球菌による乳房炎の発生は、臨床型乳房炎全体の25%以上を占め、最も多い原因菌とされている¹⁾。特に近年、OSの一つである*Streptococcus uberis* は、難治性乳房炎を引き起こす原因菌として問題となっており¹⁾、農場において罹患牛の治療費の増大など経済的被害をもたらしている。また、乳房炎原因菌を含む細菌は、薬剤耐性遺伝子を獲得することで薬剤耐性菌が出現するが、海外ではこれらプラスミド耐性遺伝子の存在や、その保有状況の調査が報告されている^{2),3),4)}。しかし、国内におけるOSの薬剤感受性についての報告は少なく、これまで国内におけるレンサ球菌の薬剤耐性遺伝子の保有状況の報告はない。そこで、今回、過去に本県の乳汁検査で分離されたOSについて、菌種の動向比較を行い、乳房炎由来レンサ球菌の薬剤感受性試験と薬剤耐性に関わる遺伝子の保有調査を行ったので、その概要を報告する。

材料及び方法

1 供試菌株

平成22～24年度（前期）及び平成28～30年度（後期）に、栃木県内の乳汁検査で分離されたOS 100株（前期：49株、後期：51株）を用いた。

2 方法

(1) 菌種同定

分離菌株の同定は、市販キット（Api Strep20、バイオメリュウ社）を用いるとともに、*Streptococcus uberis*²⁾、*S. dysgalactiae*²⁾、及び*Enterococcus faecium*⁵⁾ については、PCRにより行った。

(2) 薬剤感受性試験

ア 一濃度ディスク法

CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute)⁶⁾ の方法に準拠し、供試薬剤はアンピシリン(ABPC)、ベンジルペニシリン(PCG)、セファゾリン(CEZ)、セフトキシム(CTX)、カナマイシン(KM)、ゲンタマイシン(GM)、エリスロマイシン(EM)、テトラサイクリン(TC)、クロラムフェニコール(CP)、シプロフロキサシン(CPFX)、エンロフロキサシン(ERFX)及びピルリマイシン(PLM)の12薬剤を使用した。また、精度管理株として、レンサ球菌は*S. pneumoniae* (ATCC49619) を、*E. faecium* は*E. faecalis* (ATCC29212) を使用した。

イ 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定

フルオロキノロン系薬剤であるCPFX及びERFXの2薬剤について、動物用抗菌剤研究会報

の方法に準じた微量液体希釈法⁷⁾により実施した。精度管理株は一濃度ディスク法と同様とした。

(3) 薬剤耐性遺伝子保有状況調査

TC系薬剤については薬剤排泄ポンプに関与する*tetK*、*L*、標的部位の変異に関与する*tetM*、*O*、*S*²⁾を、マクロライド(ML)系薬剤については薬剤排泄ポンプに関与する*mefA*、標的部位の変異に関与する*erm A*、*B*³⁾を、リンコマイシン(LIN)系薬剤については薬剤不活化に関与する*linB*^{3,4)}について、PCRにより実施した。

結果

1 分離菌内訳

前期(49株)は、*S. uberis* 21株(42.8%)、*S. bovis* 20株(40.8%)、*S. dysgalactiae* 4株(8.2%)、*Lactococcus*属菌及び同定できなかった*Streptococcus*属菌(以下、*S. spp.*) 4株(8.2%)であった(図1)。また、後期(51株)は*S. uberis* 22株(43.1%)、*S. dysgalactiae* 5株(9.8%)、*E. faecium* 3株(5.9%)、*S. spp.* 21株(41.2%)だった(図2)。伝染性乳房炎の原因菌であるSAGは、前期後期を通じ分離されなかった。

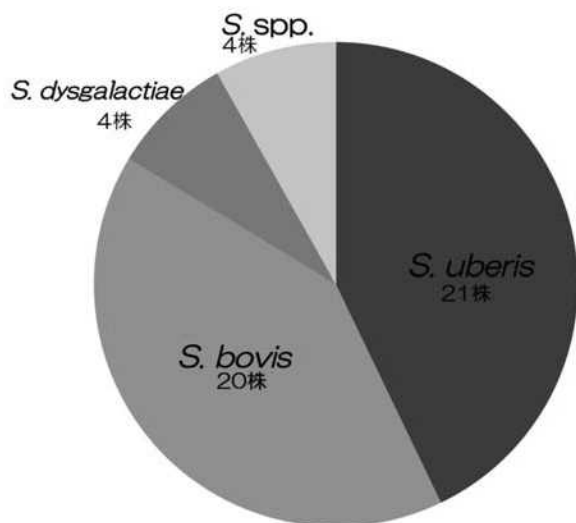


図1 前期分離菌内訳(平成22~24年度)

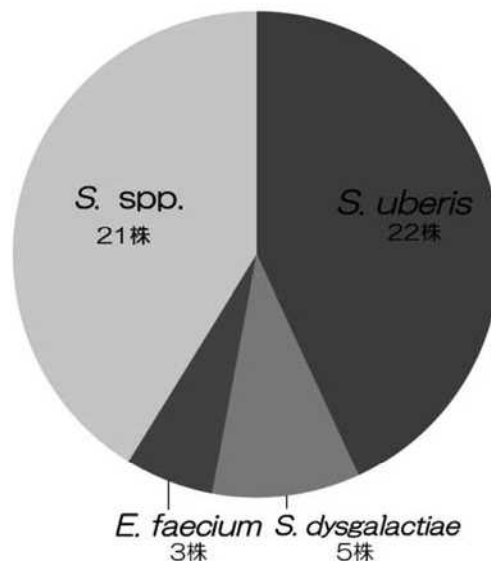


図2 後期分離菌内訳(平成28~30年度)

2 菌種毎の薬剤耐性率

全ての菌種において、ABPC、PCG、CTX、CPIに耐性は認められなかった。

*S. uberis*については、CEZ(前期(以下、略)0%、後期(以下、略)4.5%)、KM(81.0%、63.6%)、GM(71.4%、63.6%)、EM(9.5%、4.5%)、TC(9.5%、36.4%)、PLM(14.3%、31.8%)に耐性を認めた。特にTC、PLMについては、後期に耐性率が上昇した(図3)。

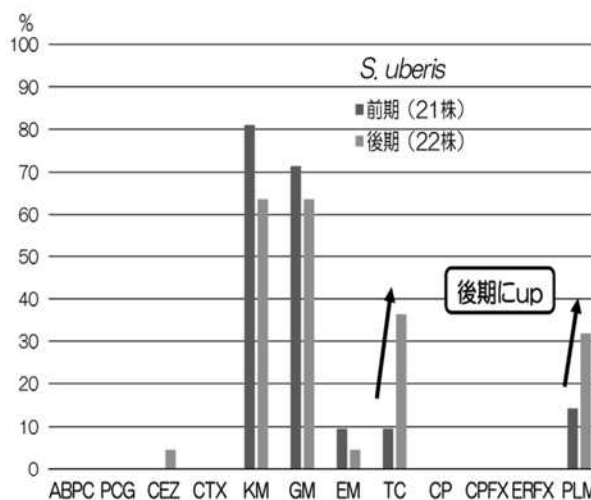


図3 *S. uberis*の薬剤耐性率

S. dysgalactiae については、KM (75.0%、100%)、GM (50.0%、20.0%)、TC (50.0%、0%) に耐性を認めた。(図4)。

S. bovis は前期のみ分離され、KM (100%)、GM (10.0%)、TC (10.0%)、CPFX (5.0%)、ERFX (15.0%) に耐性を認めた(図4)。

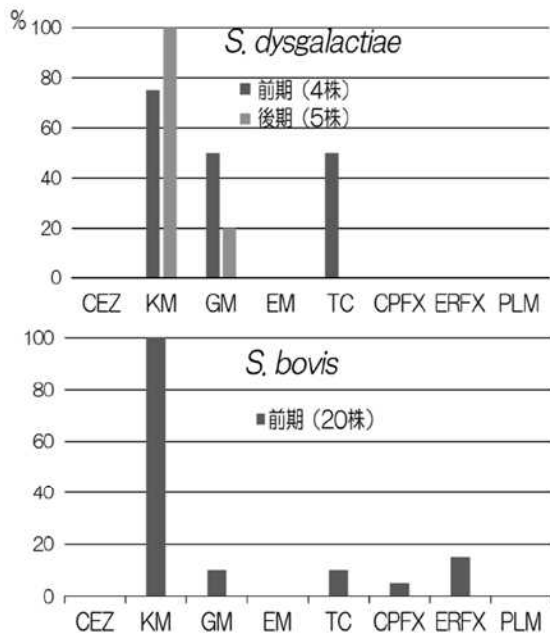


図4 *S. dysgalactiae* 及び *S. bovis* の薬剤耐性率

S. spp. については、CEZ (25.0%、0%)、KM (75.0%、81.0%)、GM (0%、9.5%)、EM (25.0%、0%)、TC (25.0%、9.5%)、CPFX (25.0%、4.8%)、ERFX (25.0%、9.5%)、PLM (25.0%、0%) に耐性を認めた(図5)。

E. faecium は後期のみ分離され、CEZ (100%)、KM (100%)、GM (66.7%)、EM (33.3%)、CPFX (66.7%)、ERFX (100%) に耐性を認めた(図5)。

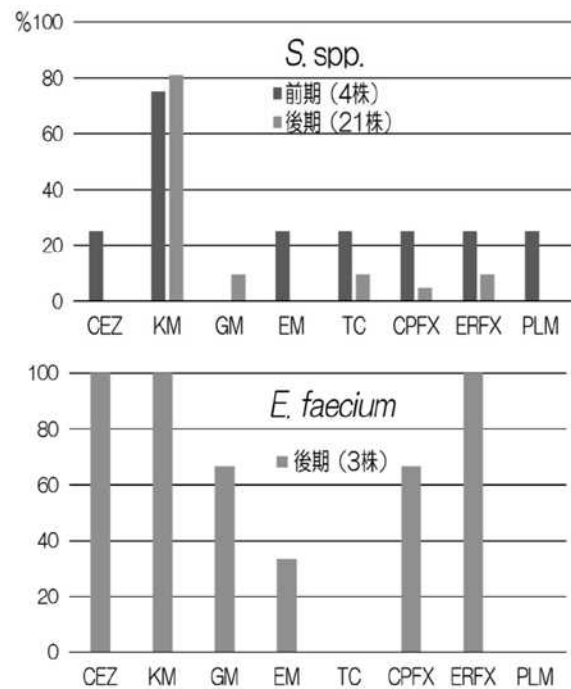


図5 *S. spp.* 及び *E. faecium* の薬剤耐性率

3 菌種毎の薬剤耐性数

菌種毎の薬剤耐性数は、*S. uberis* (5薬剤耐性：1株、4薬剤耐性：5株、3薬剤耐性：2株、2薬剤耐性：24株、1薬剤耐性：5株)、*S. bovis* (3薬剤耐性：1株、2薬剤耐性：6株、1薬剤耐性：13株)、*S. dysgalactiae* (3薬剤耐性：1株、2薬剤耐性：3株、1薬剤耐性：4株)、*S. spp.* (6薬剤耐性：1株、2薬剤耐性：6株、1薬剤耐性：15株)、*E. faecium* (6薬剤耐性：1株、5薬剤耐性：1株、3薬剤耐性：1株) だった(表1)。

表1 菌種毎の薬剤耐性数

菌種 \ 薬剤耐性数	0	1	2	3	4	5	6	株数
<i>S. uberis</i>	6	5	24	2	5	1		43
<i>S. bovis</i>		13	6	1				20
<i>S. dysgalactiae</i>	1	4	3	1				9
<i>S. spp.</i>	3	15	6				1	25
<i>E. faecium</i>				1		1	1	3

4 フルオロキノロン系薬剤のMIC

CPFXのMICは、前期及び後期ともに0.5～8 μ g/mlの範囲内だった。ERFXについては、前期の0.5～8 μ g/mlから、後期は1～8 μ g/mlとなり、若干変化を認め、MIC₉₀も4 μ g/mlから8 μ g/mlに上昇した(表2)。

表2 CPFX及びERFXにおけるMIC

CPFX										計 株数	MIC ₅₀ MIC(μ g/ml)	MIC ₉₀ MIC(μ g/ml)	
MIC(μ g/ml)													
≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>128			
前期	7	14	15	11	2						49	2	4
後期		5	26	8	10	2					51	1	4

ERFX										計 株数	MIC ₅₀ MIC(μ g/ml)	MIC ₉₀ MIC(μ g/ml)	
MIC(μ g/ml)													
≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>128			
前期			8	15	8	13	5				49	2	4
後期			21	12	10	8					51	2	8

※MIC₅₀: 50%の菌の発育を阻止する濃度

MIC₉₀: 90%の菌の発育を阻止する濃度

5 薬剤耐性遺伝子保有状況調査

TC系薬剤の耐性遺伝子については、TC耐性17株中、*tetM* 3株 (*S. bovis* 1株、*S. spp.* 2株)、*tetO* 3株 (全て*S. uberis*)、*tetS* 8株 (*S. uberis* 7株、*S. spp.* 1株) に認められ、TC感受性73株中1株 (*S. spp.*) が*tetM* を保有していた。*tetK*、*L* は全株陰性だった。

ML系薬剤の耐性遺伝子については、EM耐性5株中*ermA* 3株 (全て*S. uberis*)、*ermB* 2株 (全て*S. uberis*) に認められた。また、EM感受性91株中36株 (*S. uberis* 33株、*S. spp.* 3株) とEM中間4株中1株 (*S. uberis*) が*ermA* を保有していた。*mefA* は全株陰性だった。

LIN系薬剤の耐性遺伝子については、PLM耐性11株中、*linB* 8株 (全て*S. uberis*) に認められた(表3)。

まとめ及び考察

今回の調査結果から、供試したOSは、前期、後期ともに4割以上が*S. uberis* であり、多剤耐性傾向であることが判明した。本菌は全国的にも難治性乳房炎の原因菌として報告されているが¹⁾、本県ではこれまで迅速な回答のため菌種同定まで実施していなかったことから、分離状況は不明であった。今回の調査から、県内でも乳房炎の原因菌として広く浸潤していることが判明した。また、PLMはブドウ球菌やレンサ球菌に対して抗菌活性のある乳房炎治療薬として国内で販売された比較的新しい薬剤であるにも拘わらず、今回の調査において耐性が11株確認され、その内10株が本菌であった。本菌を疑う難治性乳房炎に遭遇した場合は、今回の調査で多剤耐性傾向を認めたことから、菌種同定と有効薬剤の治療による対策が重要と思われた。しかし、本菌はバイオフィルムを形成するため、*in vitro*では有効薬剤であっても、*in vivo*ではバイオフィルムにより薬剤が作用しない場合があるとの報告がある^{8),9)}。そのため、治療に対して乳房内の洗浄とショート乾乳を併用した乳房炎軟膏が有効とされる報告もあることから¹⁰⁾、本菌による乳房炎に遭遇した場合は、その治療及び対策については、症状や治療経過をみながら臨床獣医師や畜主と相談して対応する必要があると考えられた。

菌種動向の比較では、*S. bovis* が前期にのみ分離された一方で、後期では、分離された*Lactococcus* 属菌や*Enterococcus* 属菌がOSと判定されていた事例もあった。*E. faecium* や*S. spp.* は多剤耐性傾向であったが、農場での薬剤使用による耐性菌の出現によるものかは不明であり、環境中にこれらの菌が浸潤して、乳房炎の原因菌として感染している可能性も考えられた。

また、近年、家畜由来の大腸菌や牛呼吸器病原菌などでフルオロキノロン系薬剤耐性菌の増加が報告されて問題となっている

表3 薬剤耐性遺伝子保有状況調査

系統 薬剤	耐性 遺伝子	<i>S. uberis</i> (43株)			<i>S. bovis</i> (20株)			<i>S. dysgalactiae</i> (9株)			<i>S. spp.</i> (25株)			<i>E. faecium</i> (3株)			合計 (100株)			
		耐性	中間	感受性	耐性	中間	感受性	耐性	中間	感受性	耐性	中間	感受性	耐性	中間	感受性	耐性	中間	感受性	
TC	<i>tet</i>	<i>K</i>	0/10	—	0/33	0/2	—	0/18	0/2	0/7	—	0/3	0/3	0/19	—	—	0/3	0/17	0/10	0/73
		<i>L</i>	0/10	—	0/33	0/2	—	0/18	0/2	0/7	—	0/3	0/3	0/19	—	—	0/3	0/17	0/10	0/73
	<i>M</i>	<i>O</i>	3/10	—	0/33	0/2	—	0/18	0/2	0/7	—	0/3	0/3	0/19	—	—	0/3	3/17	0/10	0/73
		<i>S</i>	7/10	—	0/33	0/2	—	0/18	0/2	0/7	—	1/3	0/3	0/19	—	—	0/3	8/17	0/10	0/73
		<i>A</i>	0/3	0/1	0/39	—	—	0/20	—	0/1	0/8	0/1	0/1	0/23	0/1	0/1	0/1	0/5	0/4	0/91
ML	<i>erm</i>	<i>A</i>	3/3	1/1	33/39	—	—	0/20	—	0/1	0/8	0/1	0/1	3/23	0/1	0/1	0/1	3/5	1/4	36/91
		<i>B</i>	2/3	0/1	0/39	—	—	0/20	—	0/1	0/8	0/1	0/1	0/23	0/1	0/1	0/1	2/5	0/4	0/91
LIN	<i>lin</i>	<i>B</i>	8/10	—	0/33	—	—	0/20	—	—	0/9	0/1	—	0/24	—	—	0/3	8/11	—	0/89

TC:テトラサイクリン、ML:マクロライド、LIN:リンコマイシン

11),12),13),14)。今回の調査では、株数は少ないものの、*E. faecium* や *S. spp.* でフルオロキノロン耐性が認められた。CPFXとERFXについて、MICを測定した結果、ともに2峰性の分布は認められず、耐性は認められなかったが、ERFXでは、MIC₉₀が前期に比べ後期に上昇していたことから、今後もその動向について注視する必要があると思われた。

薬剤耐性遺伝子の保有状況調査では、TC及びML系薬剤はいずれも標的部位の変異に関する耐性遺伝子 (*tetM*, *O*, *S*, *ermA*, *B*) が確認されたが、遺伝子を保有しない耐性株も存在し、表現型と一致しない結果となった。薬剤排泄ポンプに関わる遺伝子 (*tetK*, *I*, *mefA*) は、今回は検出されなかったが、海外では *tetK*, *I* を保有している報告もあるので^{2),15)}、今後、さらに株数を増やして検討する必要があると思われた。また、*ermA* ではEM感受性91株中36株が陽性であり、そのうち33株は *S. uberis* であった。このことは、*S. uberis* は表現型では

まだ薬剤耐性を発現していないものの、他の株に比べ耐性遺伝子を獲得しやすい性質を持つ可能性が考えられた。LIN系薬剤では、PLM耐性の *S. uberis* 10株中8株と、*linB* を高率に保有しており、PLM耐性に *linB* 遺伝子獲得が強く関わっていることが示唆された。牛乳房炎由来OSの薬剤耐性遺伝子についての調査は、国内での報告はない。今回の結果から、薬剤耐性（表現型）と遺伝子保有について、相関する結果は得られなかったが、今後は、MICとの関連性を検証する必要があると思われた。

また、PLM耐性であった *S. uberis* 11株の分離農場を調べたところ、一農場で5株分離されていることが判明した。PLMの不適切な使用を憂慮し、薬剤使用状況等の個別調査を実施した結果、当該農場では平成29～30年に *S. uberis* による乳房炎がまん延していた。発生時にはPLMを当初使用していたものの、その後CEZの乳房炎軟膏に切り替えており、PLMの多用はしていなかった。また、*S. uberis* による乳房炎は、

麦わらを敷料としている環境で多発するとされている¹⁾が、使用歴は確認できなかった。一方で、当該農場の牛の移動履歴を調べたところ、外部からの牛の導入が多いことが確認された。今回、*S. uberis* が分離された牛は全て導入牛であったことから、体表もしくは糞便に存在したPLM耐性株が環境中、特に牛床や敷料を汚染し、乳頭から侵入した可能性も考えられた。

今回の調査において、OSと判定したその多くは環境性乳房炎原因菌であった。牛乳房炎の治療には抗菌性物質による治療が有効であるが、これらの菌は、牛床や敷料に乳頭が接触することで感染するものであり、搾乳衛生の徹底により予防できるため、今後乳汁検査及び巡回指導を通じて、畜主へ乳房炎防除対策を啓発していきたい。また、*S. uberis* や*S. spp.*において多剤耐性傾向の菌が分離されていることから、今後も牛乳房炎由来OSの薬剤感受性状況のモニタリング及び耐性遺伝子保有状況を調査するとともに、獣医師や畜主に対して抗菌性物質の適正使用の指導に努めていきたい。

引用文献

- 1) 牛の乳房炎治療ガイドライン 緑書房
- 2) E. Kaczorek, J. Malaczewska, 2017, Phenotypic and genotypic antimicrobial susceptibility pattern of *Streptococcus spp.* Isolated from cases of clinical mastitis in dairy cattle in Poland, J. Dairy Sci., 100:6442-6453
- 3) Rafael S. Duarte, Bruna C. bellei, 2005, Distribution of Antimicrobial Resistance and Virulence-Related Genes among Brazilian Group B Streptococci Recovered from Bovine and Human Sources, Antimicrob Agents and Chemother, vol.49, No.1, 97-103
- 4) Bozdogan,B., L. Berrezouga, 1999, A New Resistance Gene, *linB*, Conferring Resistance to Lincosamides by Nucleotidylation in *Enterococcus faecium* HM1025, Antimicrob Agents and Chemother, vol.43, No.4, 925-929
- 5) S. Cheng, F. K. Mccleskey, 1997, A PCR Assay for Identification of *Enterococcus faecium* , J of Clinic Microb, Vol.35, No.5, 1248-1250
- 6) CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, VET01, (5th ed.) , VET08, (4th ed.) 2018 : Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, USA
- 7) 動物用抗菌剤研究会, 2003, 動物由来細菌に対する抗菌性物質の最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法
- 8) 田中秀和, 井上宣子, 2017, 慢性乳房炎 (*Streptococcus uberis* 感染症) に対するショート乾乳治療の取り組み, 臨床獣医, Vol.35, No.6, 12-18
- 9) 山下祐輔, 2017, 牛の乳房炎とバイオフィルム, 臨床獣医, Vol.35, No.6, 19-26
- 10) 菊池允人, 菅原久枝, 2019, 乳牛の難治性乳房炎に対する高張食塩水による乳房内洗浄とショート乾乳を併用した治療の効果, 家畜診療 66巻7号, 425-429
- 11) 田村豊, 2017, 食用動物に由来する薬剤耐性菌の現状と対策, 環境感染誌Vol. 32 no. 6
- 12) 赤間俊輔, 2014, 県内で分離された豚由来大腸菌の性状検査及び分子疫学的解析, 第56回栃木県家畜保健衛生業績発表会集録
- 13) 山本敦子, 2018, 2010~2018年に十勝管内で分離された牛由来病原細菌の薬剤耐性調査, 平成30年度北海道業績発表会
- 14) 勝田賢, 2010, 牛呼吸器主要原因菌 *Mannheimia haemolytica* の薬剤感受性について, 家畜感染症学会誌, Vol.5, No.2
- 15) J. R. Velez, M. Cameron, 2017, Whole-Genome Sequence Analysis of Antimicrobial Resistance Genes in *Streptococcus uberis*

and *Streptococcus dysgalactiae* Isolates from
Canadian Dairy Herds, *Frontiers in Vet Sci.*,
Vol.4, 63