

8 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。

材料と方法

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、ビオメリュウ社)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)、セフォタキシム(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。

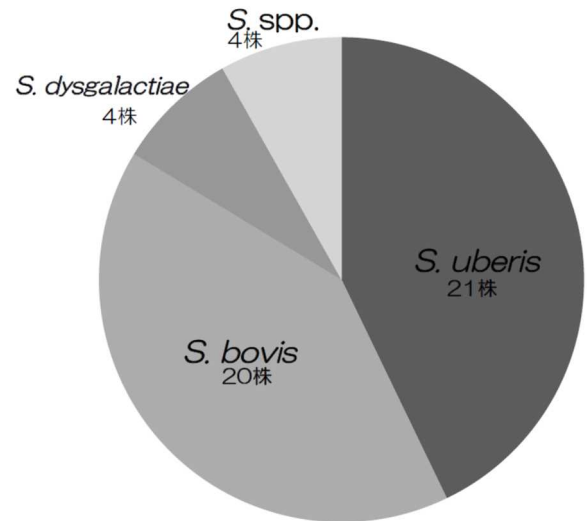


図 1 前期分離菌内訳 (平成 22~24 年度)

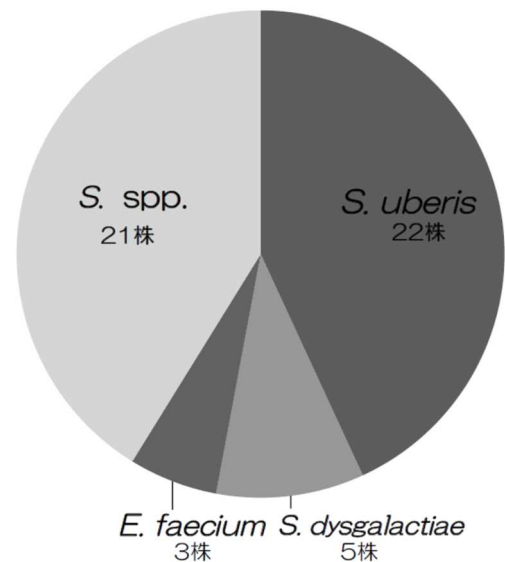


図 2 後期分離菌内訳 (平成 28~30 年度)

2 菌種毎の薬剤耐性率

全ての菌種において、ABPC、PCG、CTX、CP 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)。

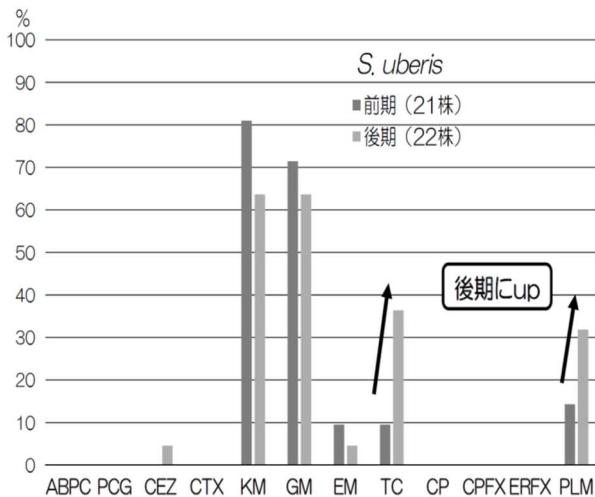


図3 *S. uberis* の薬剤耐性率

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)。

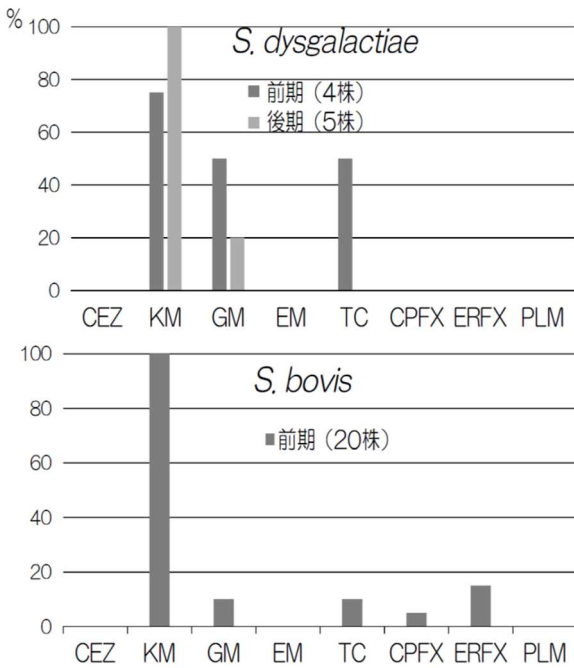


図4 *S. dysgalactiae* 及び *S. bovis* の薬剤耐性率

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)。

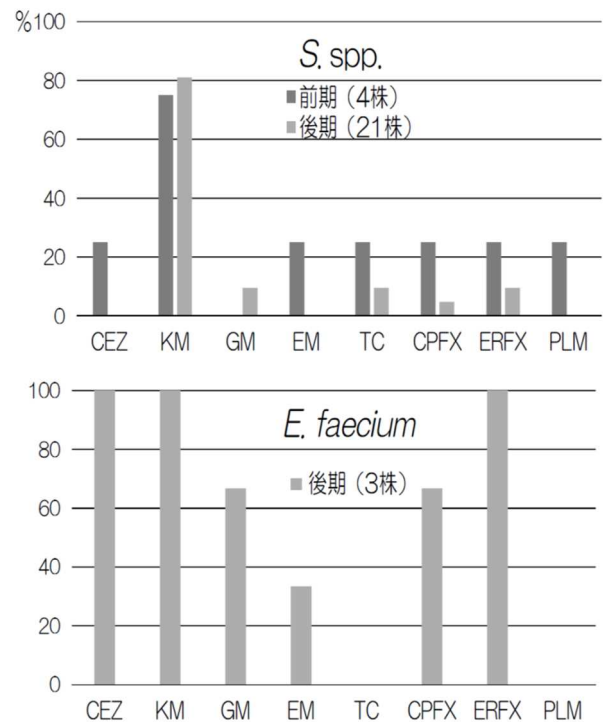


図5 *S. spp.* 及び *E. faecium* の薬剤耐性率

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							株数
	0	1	2	3	4	5	6	
<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 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲内だった。ERFX については、前期の 0.5～8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から、後期は 1～8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となり、若干変化を認め、MIC₉₀ も 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に上昇した（表 2）。

表 2 CPFX 及び ERFX における MIC

CPFX													
	MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)									計 株数	MIC ₅₀ MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC ₉₀ MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32				64
前期	7	14	15	11	2						49	2	4
後期		5	26	8	10	2					51	1	4

ERFX													
	MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)									計 株数	MIC ₅₀ MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)	MIC ₉₀ MIC($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	≤ 0.125	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32				64
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

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	K	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
	L	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
	tet M	0/10	-	0/33	1/2	-	0/18	0/2	0/7	-	2/3	0/3	1/19	-	-	0/3	3/17	0/10	1/73
	O	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
	S	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
ML	mef A	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
	erm A	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
	erm B	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	lin B	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

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^{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。CPFEX と ERFEX 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*, *1*, *mefA*) は、今回は検出されなかったが、海外では *tetK*, *1* 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