

酪農生産性向上対策と分離された黄色ブドウ球菌の性状

○中島博美 木内英昭
(飯田家畜保健衛生所)

要 約

平成 26 年度酪農生産性向上対策事業において管内 51 農場のバルク乳細菌検査を 6 月（第 1 回）と 11 月（第 2 回）に実施した。第 1 回検査後に結果に基づいて巡回指導や搾乳立会、個体乳汁検査等を実施したところ、第 2 回検査では各種細菌数の減少など事業効果が認められた。

第 1 回及び第 2 回バルク乳検査において分離された黄色ブドウ球菌 66 株について、薬剤感受性検査、 β -ラクタマーゼ産生能試験を実施したところ 6 株に多剤耐性、5 株に β -ラクタマーゼ陽性が確認された。この内 1 株から *mecA* 遺伝子が検出されたため、当該農場の全頭個体乳汁を用いて *mecA* 遺伝子陽性 SA の浸潤状況を調査したところ 2/26 頭から分離された。

これらの結果から、通常の搾乳衛生対策指導に加えて分離菌の細菌学的性状の詳細を把握することは、より適切かつ効果的な指導に資するものと考えられた。

はじめに

黄色ブドウ球菌（SA）は、ヒトにおいては食中毒の原因菌であり、また、種々の化膿性疾患の原因菌で、MRSA などの薬剤耐性が問題となっている。

ウシにおいては、搾乳機器を介して感染する伝染性乳房炎の原因菌として特に問題となっている。また、SA による乳房炎は難治性であり、長期間持続して消長を繰り返しながら乳腺組織に障害を与え慢性化傾向をたどるとされることから経済的被害が大きく、搾乳衛生対策指導に苦慮を伴うところである。

一方、細菌学的には各種遺伝子検査法などの発展により、その性状が徐々に明らかにされつつあり、その性状に基づいた現場の対応が求められるている。

1 バルク乳細菌検査

【方法】

生菌数、SA、無乳性レンサ球菌、マイコプラズマ、環境性ブドウ球菌、環境性レンサ球菌、

大腸菌、耐熱性菌を対象とし、「バルク乳スクリーニング検査マニュアル Ver. 1 (H26 長野県)」に従って検査を実施した。

計測した分離菌数 (CFU/ml) を同マニュアルの A～D の判定基準（表 1）に基づき判定し、各農場の成績とした。

第 1 回及び第 2 回の各判定基準にランクされた農場数割合を対象菌ごとに比較した。

	A 目標	B やや多い	C 多い	D 非常に多い
生菌数	<3,000	～5,000	～10,000	≥10,000
SA	0	～100	～200	≥200
無乳性レンサ球菌	0	～100	～200	≥200
マイコプラズマ	0			
環境性ブドウ球菌	<100	～200	～400	≥400
環境性レンサ球菌	<700	～1,200	～2,000	≥2,000
大腸菌群	0	～100	～400	≥400
耐熱性菌	<50	～150	～500	≥500

表 1 判定基準 (CFU/m²)

【結果】

第1回と第2回の結果を比較すると生菌数、黄色ブドウ球菌、環境性レンサ球菌、環境性ブドウ球菌、大腸菌群及び耐熱性菌について各判定基準にランクされる農場割合において改善が認められた（図1～6）。

無乳性レンサ球菌が分離された2農場は第2回では分離されず、マイコプラズマは分離されなかった。

これらは、通常の搾乳衛生対策指導の有効性を表していると考えられた。

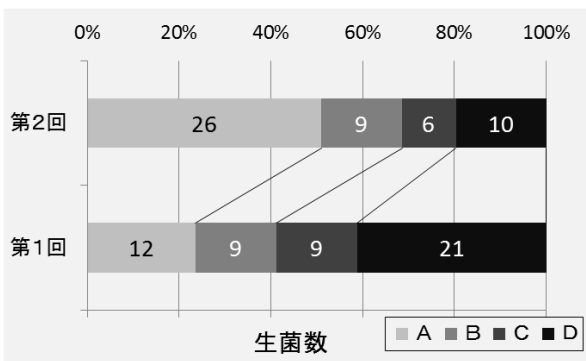


図1 生菌数

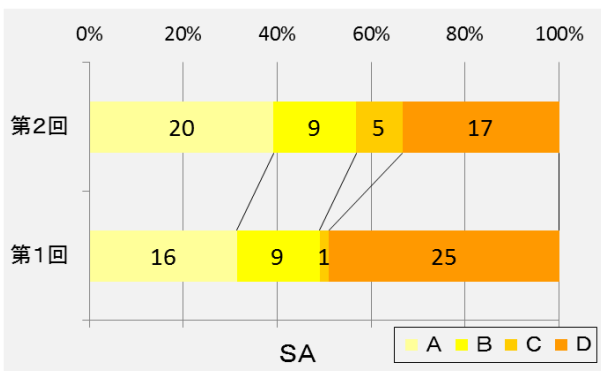


図2 SA

2 SAの細菌学的性状検査

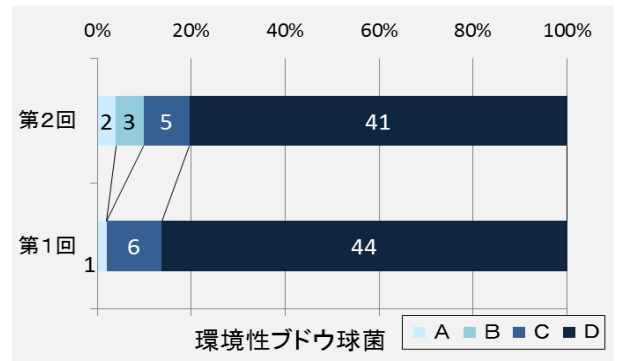


図3 環境性ブドウ球菌

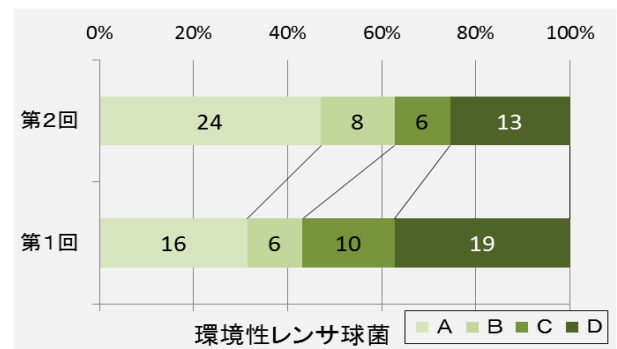


図4 環境性レンサ球菌

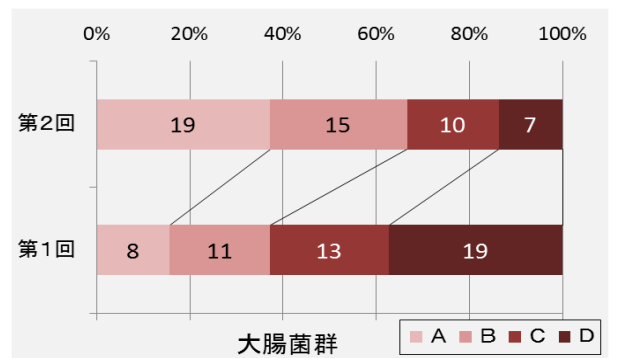


図5 大腸菌群（バルク乳検査）

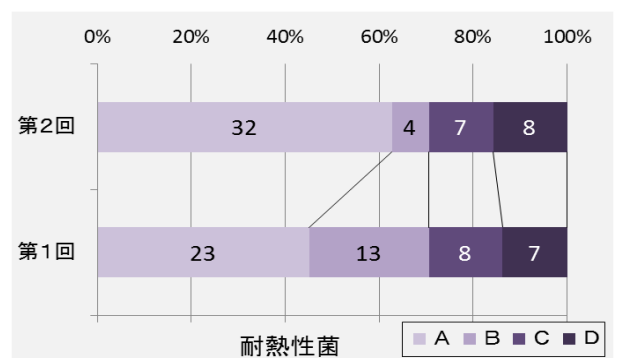


図6 耐熱性菌

【方法】

(1) 薬剤感受性

第1回バルク乳由来 SA にはアンピシリン (ABPC)、ペニシリン (PCG)、セファゾリン (CEZ)、セフロキシム (CXM)、タイロシン (TS)、オキシテトラサイクリン (OTC)、第2回バルク乳由来 SA には、この6薬剤に加えジクロキサシリン (MDIPC)、セファピリン (CEP)、カナマイシン (KM)、ゲンタマイシン (GM)、エリスロマイシン (EM)、ピリルマイシン (PLM)、エンロフロキサシン (ERFX)、マルボフロキサシン (MAR)、スルファメトキサゾール・トリメトプリム (ST) の15薬剤を供試し、一濃度ディスク法で実施した。

(2) MRSA の検出

PCR法(1)によりSAと同定された菌株のうちMRSAの薬剤耐性因子であるmecA遺伝子を標的としたPCR法(2)を実施した。陽性のものはMRSAと判断した。

さらに、これらの菌株はオキサシリンの薬剤感受性試験(DISC法)により再確認した。

(3) β-ラクタマーゼ産生能

セフィナーゼディスク(日本BD)に被検菌株の1白金耳を塗抹し、1時間後までにディスクの色調が黄色から赤色に変化したものを陽性と判定した。

(4) パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)

供試菌株の抽出遺伝子を制限酵素Sma Iにより切断し、1%アガロースゲルで電圧5.7v/cm、パルスタイム5-40秒で23時間泳動し、そのパターンを比較した。

【結果】

(1) 第1回バルク乳由来SAの薬剤感受性

第1回35農場から分離された35株について実施した各菌株の各薬剤に対する感受性パターンを比較したところ、全てに感受性(パターンA)が11株、TSに耐性(パターンB)が19株、ペニシリン系とTSに耐性(パターンC)が3株、ペニシリン系のみ耐性(パターンD)が1株、ペニシリン系とセフェム系及びTSに耐性(パターンE)が1株だった(表2)。

表2 バルク乳由来SA薬剤感受性検査結果

感受性パターン	ABPC	PCG	CEZ	CXM	TS	OTC	株数
A	S	S	S	S	R	S	19
B	S	S	S	S	S	S	11
C	R	R	S	S	R	S	3
D	R	R	S	S	S	S	1
E	R	R	R	R	R	S	1
耐性株数	5	5	1	1	23	0	
耐性率(%)	(14.3)	(14.3)	(5.0)	(5.0)	(65.7)	(0)	

(2) MRSA の検出

第1回ペニシリン系あるいはセフェム系に耐性の5株について試験を実施したところ、ペニシリン系とセフェム系の両方に耐性の認められた多剤耐性株1株がMRSA検出試験によりMRSAと確認された。

本菌が分離されたA農場で全頭個体乳汁細菌検査を実施し、搾乳牛26頭中2頭から分離された多剤耐性SAが、同様にMRSAと確認された(表3)。

(3) MRSA の薬剤感受性

このMRSAについて、上記6薬剤に9薬剤を追加し実施したところABPC、PCG、CEZ、CXM、KM、GM、EM、TS、PLM、MARの計10薬剤で耐性が確認された(表4)。

表3 A農場由来MRSAの薬剤感受性検査結果

No.	菌種	ペニシリン系			セファロスポリン系		アミノグリコシド系		マクロライド系		テトラサイクリン系		リソマイシン系		ST合剤	
		ABPC	MDIPC	PCG	CEZ	CXM	KM	GM	FM	EM	TS	OTC	PLM	ST	ST	
5	SA	R	S	R	S	S	R	R	I	R	R	S	R	S		
16	SA	R	I	R	R	R	R	R	I	R	R	S	R	S		

表4 MRSAの薬剤感受性検査結果

ペニシリン系		セファロスポリン系		アミノグリコシド系		マクロライド系		テトラサイクリン系		リソマイシン系		ST合剤		キロリド系	
ABPC	MDIPC	PCG	CEZ	CXM	KM	GM	FM	EM	TS	OTC	PLM	ST	ERFX	MAR	
R	I	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S	+	R	

(4) 薬剤感受性の比較

第1回分離株及び第2回で分離されたSA、31株を加えた計66株を比較すると、第2回ではセフェム系耐性がなくなり、ペニシリン系耐性は減少が見られた(表5)。

表5 第1回と第2回バルク乳由来SAの薬剤感受性検査結果

	農場数	ペニシリン系			セファロスポリン系		アミノグリコシド系		マクロライド系		テトラサイクリン系		リソマイシン系		キロリド系	
		ABPC	MDIPC	PCG	CEZ	CEP	CXM	KM	EM	TS	OTC	PLM	ERFX			
第1回	農場数	5	0	5	1	0	1	1	1	23	0	1	0			
	(%)	(14)	(0)	(14)	(2.9)	(0)	(2.9)	(2.9)	(2.9)	(66)	(0)	(2.9)	(0)			
第2回	農場数	1	0	1	0	0	0	1	0	21	0	0	0			
	(%)	(3)	(0)	(3)	(0)	(0)	(0)	(3)	(0)	(66)	(0)	(0)	(0)			

多剤耐性傾向を示すSAが分離された農場のうち5農場(A~E農場)について薬剤感受性検査、MRSA検出試験、β-ラクタマーゼ産生能試験を行い、第1回と第2回で比較した(表6)。

A農場では、第2回ではほとんどの薬剤で感受性となった。

またA、B、C農場でペニシリン系に耐性のみられたSA株については、β-ラクタマーゼは陽性だった。

D、E農場でみられたペニシリン系の耐性

は、第2回ではみられなくなった。

MRSAはA農場以外では検出されなかった。

表6 SA耐性株の分離農場における比較

農場	ABPC	MDIPC	PCG	CEZ	CEP	CXM	KM	EM	OTC	PLM	ERFX	mecA	β-L
1 A	R	I	R	R	S	R	R	R	S	R	+	+	+
	S	S	S	S	S	S	S	I	S	S	+++	-	-
2 B	R	S	R	S	S	S	S	I	S	S	+++	-	+
	R	S	R	S	S	S	I	I	S	S	+++	-	+
3 C	R	S	R	S	S	S	S	I	S	S	+++	-	+
	R	S	R	S	S	S	S	I	S	S	+++	-	-
4 D	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	+++	-	-
	R	S	R	S	S	S	S	I	S	S	+++	-	-
5 E	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	+++	-	-
	S	S	S	S	S	S	I	I	S	S	+++	-	-

(上段：第1回、下段：第2回)

(5) PFGEによる解析

多剤耐性傾向を示すSAが分離された農場のうち8農場(A~H農場、表7)について、その泳動パターンを比較すると、検体No. 1~3と13~17が同一パターン(I)、No. 6、8、9、12が同一パターン(IV)だった。これら2つのパターンは、日本の牛由来SAの75%を占める牛に特異的なSAが持つパターンだった。その他のNo. 4(II)、No. 5(III)、No. 7、10、11(V)は牛に特異的でないSAのパターンだった(図7)。

表7 PFGEの検体情報

検体No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9
採材月	6月	11月	6月	11月	6月	6月	6月	11月	11月
農場名	G農場		F農場		C農場	H農場	A農場		
検体No.	10	11	12	13	14	15	16	17	
採材月	7月	7月	6月	11月	6月	11月	6月	11月	
農場名	A農場		B農場		D農場		E農場		

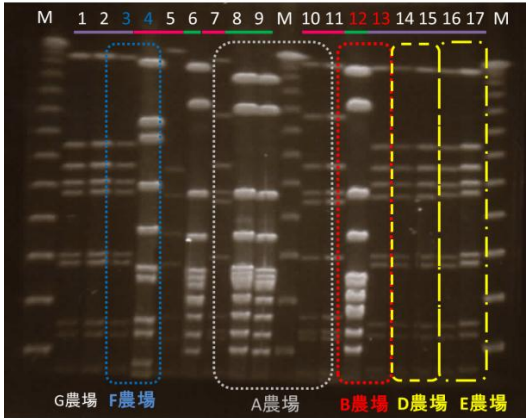


図7 PFGE の泳動像

一方、G、D、Eの3農場では、第1回と第2回は同一パターンだった。F農場では牛に特異的なパターンから牛に特異的でないパターンになった。B農場では第1回、2回のパターンは異なるが、どちらも牛に特異的なSAのパターンだった。

表8 A農場におけるPFGE検体の詳細

検体No.	採材月	由来	mecA遺伝子
7	6月	バルク乳	+
8	11月	バルク乳	-
9	11月	バルク乳	-
10	7月	個体乳 (No. 5)	+
11	7月	個体乳 (No. 16)	+

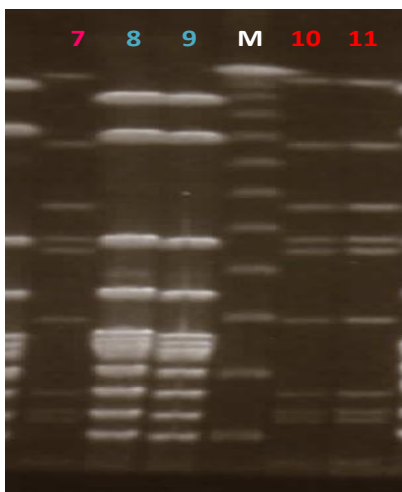


図8 A農場のPFGE

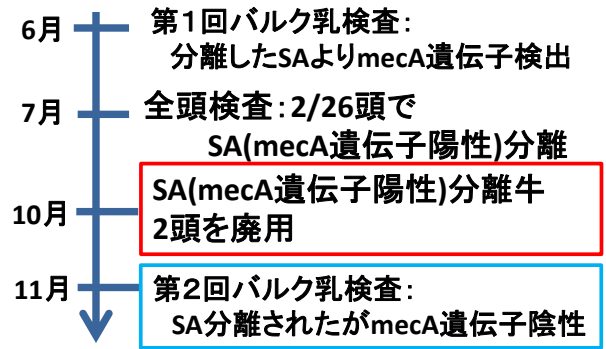


図9 A農場における経過

MRSA が分離されたA農場について着目すると第1回バルク乳検査で分離されたタイプ(検体No. 7)と、その後の全頭個体乳汁検査で分離されたタイプ(検体No. 10、11)は同一だったが、MRSA 分離牛を廃用した後の第2回バルク乳検査で分離されたSAは、牛に特異的なタイプ(検体No. 8、9)であり、mecA 遺伝子も検出されなかった(表8、図8、9)。

【考察とまとめ】

近年、SAの薬剤耐性頻度が次第に高くなり家畜衛生、公衆衛生上問題となってきた。

各種細菌の抗菌薬に対する耐性獲得の重要な機構の一つは、β-ラクタマーゼによるβ-ラクタム系(ペニシリン系及びセファロスポリン系)抗菌薬の不活化である。今回、β-ラクタマーゼ陽性のSAは分離されたSA株の10%未満だった。この検出率は、乳房炎乳汁由来SAの39.8%がβ-ラクタマーゼを産生したとされる小川らの国内の報告(4)、66.1%が産生したとされるJonesらの英国の報告(5)より低い値だった。また第1回と第2回バルク乳検査から分離されたSAの薬剤感受性検査では、第2回の方がペニシリン系耐性に減少傾向がみられた。要因は不明であるが今後もモニタリングを継続する必要があると考える。

一方、今回分離されたMRSAについて、別途

詳細な検査（MLST 法などによる MRSA および SA の遺伝学的検査）を実施したところヒト SA の代表的遺伝子型で、市中感染型 MRSA と判明した。

MRSA は、接触感染で容易に拡がり、環境中に長く存在することができ、ヒトに対しては定着・保菌という状態をとることができる(3)。A 農場における本菌の遺伝子型はヒトの市中感染型 MRSA の代表的な型であることから、農場で耐性化した可能性は低く、ヒトの MRSA が農場内に持ち込まれた可能性が高いと判断される。当該農場では速やかに MRSA 保菌牛を廃用にしたことで、農場内でのまん延は防御された。

PFGE において、G、D、E の 3 農場では農場規模から 1 つのタイプが農場内に存在していると推察された。F 農場では、6 月以降の新たな SA の侵入の可能性が示唆された。B 農場では、以前から多くの SA 保菌牛がいることや導入牛がほとんどいないことなどから、元々 2 つのタイプが農場内にいた可能性が高いと考えられた。このように疫学的解析を実施し、牛に特異的なタイプか特異的でないタイプかを確認することで牛に定着しやすいかの推察や農場内の SA の動態を推察することができた。

今回、医学領域で問題となっている MRSA がバルク乳から分離されたが、日本では、1999 年から農林水産省動物医薬品検査所が中心となって、家畜衛生分野における抗菌剤耐性モニタリング調査が行われている。2000 年の調査(6)によると牛、豚、鶏の病畜由来 SA は ABPG(37.9%)と PCG(36.4%)に耐性率が高く、ついでジヒドロストレプトマイシン(10.6%)、OTC(7.5%)、KM(6.1%)、EM(4.5%)の順であり、セフェム系、ニューキノロン系耐性株は検出されなかった。また、1997 年と 1998 年のウシ乳房炎由来株の調査(7)でも同様な傾向が示され

ており、治療にあたっての抗菌剤の慎重使用を啓発する必要があると考えられた。

今回、酪農生産性向上対策事業において、通常の搾乳衛生対策指導の効果は認められたが、特に問題とされる SA に着目すると依然 60%以上の農場に浸潤しており、これらの農場において SA は搾乳牛中 6~50%の保菌率だった。今後は、通常の搾乳衛生対策指導に加えて、農場ごとの分離菌の細菌学的性状を検査・分析することで、より適切で効果的な乳質向上指導が可能になると考えられた。

謝辞

検査にあたりご協力やご助言を頂きました(独)動物衛生研究所の秦 英司先生に深謝いたします。

引用文献

- Hata E et al. J Vet Med Sci. 2006. 68:165-170.
Jonas D et al. J Clin. Microbiol. 2002. 40:1821-1823.
長尾美紀、太田美智男 日本臨床微生物学雑誌 Vol.17 No.3 2007. 159-167
小川美敬、遠藤俊夫 日獣会誌 44 202-205(1991)
Jones, T. O. and Heath, P. J.: Vet. Rec., 117, 340 (1985)
Morioka A., Asai T., et al. J. Vet. Med. Sci., 67, 207-210(2005)
Yoshimura H., et al. J. Vet. Med., B49, 457-460(2002)