乳房炎起因菌の薬剤耐性化の現状とバンコマイシン耐性腸球菌（VRE），基質拡張型β-lactamases（ESBLs）産生菌，Metallo-β-lactamase（MBL）産生菌，多剤耐性緑膿菌（MDRP）の分離状況

大西　守

根室地区 NOSAI 検査室（〒 086-1105　北海道標津郡中標津町西 5 条南 11 丁目 5 番地）

近年，根室地方における乳牛の乳房炎起因菌のうち，腸球菌や腸内細菌群で薬剤耐性化が進行しつつある。また，国内のヒトやニワトリ，ウシなどの家畜から，欧州でのアボパルシンの飼料添加が原因となり鶏由来とされるバンコマイシン耐性腸球菌（VRE）［9，12］や，日本，極東，欧州，南米で広まっている CTX-M 型のβ-lactamase（BL）を産生する *Escherichia coli*，*Klebsiella pneumoniae* が分離されている［15，16，21］。この型の BL は *Kluyvera* 属菌が保有する染色体性クラス A の BL に酷似していて，セフタジジム（CAZ）よりセフォタキシム（CTX），セフポドキシム（CPDX）を効率よく分解する。

また，新たな院内感染菌として *Pseudomonas aeruginosa*，*Serratia marcescens* などで，イミペネム（IMP）などのカルバペネム系（CAPMs）を分解する IMP-1 型の metallo-β-lactamase（MBL）産生菌［1，2］や，CAPMs に加え，アミノグリコシド系（AGs），フルオロキノロン系（FQs）の 3 系統の抗菌剤に耐性を示す Multiple-drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*（MDRP）が出現し問題化している［2，6］。これらの多剤耐性菌はプラスミド媒介性に耐性遺伝子を接合伝達すると共に，動物にも感染する可能性がある。

本稿では乳房炎起因菌のうち多剤耐性傾向がみられる *P. aeruginosa*，*S. marcescens*，*E. coli*，*K. pneumoniae* および *Enterococcus faecium* の 5 菌種の薬剤耐性と，これらの菌種での MBL 産生菌，MDRP，extended spectrum β-lactamases（ESBLs）産生菌，VRE の分離状況に関する著者らの研究と，乳牛における多剤耐性菌の今後の展望を述べる。

1．供試菌株と細菌検査法

1）供試菌株

2005 年 9 月～2007 年 8 月に根室支庁全域の乳牛の主に臨床型乳房炎乳汁から分離された *P. aeruginosa* 200 株，*S. marcescens* 64 株，耐性 *E.coli*（アンピシリン（ABPC），オキシテトラサイクリン（OTC），スルファメトキサゾール・トリメトプリム（ST）の 3 剤以上に耐性）28 株，*K. pneumoniae* 14 株，*Klebsiella ozaenae* 1 株および耐性 *E. faecium*（ベンジルペニシリン（PCG），ABPC の 2 剤以上に耐性）9 株を供試した。

また，診療カルテから臨床症状と予後を調査した。

2）採材と細菌培養

消毒液に浸したタオルとアルコール綿で乳頭，乳頭口を清拭し，雑菌が入らないように乳汁を採取した。乳汁 25 μl を 5% 羊血液加寒天培地（BBL）の 1/4 区画に，10 μl をマンニット食塩培地（栄研化学）の 1/8 区画に綿棒を用いて塗布

し，35 ± 2℃ で 18 ～ 42 時間，好気培養した。

3）起因菌の有意菌数

乳汁約 25 μl 中の *P. aeruginosa* と *E. faecium* は菌数が≧30 個なら 2 菌種発育しても有意，≧10 ～ 30 個なら純培養的に発育したものを有意とした。*S. marcescens*，*E. coli* および *K. pneumoniae* は≧10 個で純培養的に発育したものを有意と判定した［19］。

4）同定法

腸球菌はカタラーゼ陰性，食塩抵抗性（弱＋），ピロロリドニルアリルアミダーゼ（PYR）試験（関東化学）陽性株から，胆汁エスクリン寒天培地（BBL）でエスクリン加水分解陽性集落を分離し，ラピッド ID32 ストレップアピ（日本ビオメリュー）を用いて同定した。

E. coli は灰色集落，*K. pneumoniae* は灰白粘調性の集落，*S. marcescens* は桃色～赤褐色の集落でオキシダーゼ陰性の株を ID テスト EB20（日水製薬）を用いて同定した。

P. aeruginosa は β 溶血緑灰色集落でオキシダーゼ陽性株を ID テスト NF18（日水製薬）を用いて同定した。

5）O 抗原血清型別試験

P. aeruginosa と *S. marcescens* については，それぞれの O 群型別免疫血清（デンカ生研）を用いて型別した。

6）薬剤感受性検査

（1）ディスク拡散法（CLSI 標準法）：McFarland No.0.5 の標準液（栄研化学）と同じ濁度に生理食塩液を用いて調整した菌液を綿棒に適量採取し，Mueller-Hinton Ⅱ寒天培地（BBL）に 3 重に全面塗布し，SN ディスク（日水製薬）を置き，18 時間培養後に判定した［7］。なお，*E. faecium* には羊血液加 Mueller-Hinton Ⅱ寒天培地（極東製薬）を用いた。グラム陰性の 4 菌種は 19 剤（表 1，2，4，5），*E. faecium* は 21 剤（表 3）について検査した。

（2）微量液体希釈法（CLSI 標準法）：McFarland No.0.5（吸光度波長 530nm）：0.08 ～ 0.1）の濁度に生理食塩液を用いて調整した菌液 50 μl を 12ml の Mueller-Hinton ブロス（極東製薬）に接種・撹拌し，オプトパネル（極東製薬）に 100 μl ずつ分注し，20 時間培養後に判定した［7］。*P. aeruginosa*，*S. marcescens*，*E. coli*，*K. pneumoniae* および *K. ozaenae* には 12 剤 8 濃度で MIC を測定し，*E. faecium* には自家製 MIC パネル（15 剤 12 濃度）を用いた。判定は両方法とも CLSI の動物用 M31-A2 と M100-S16 のブレイクポイントに準拠した。

7）高度耐性菌のスクリーニング検査・確認検査

（1）MBL：IMP の MIC が≧8 μg/ml をスクリーニング陽性とした。

（2）ダブルディスクシナジーテスト（DDST）：2 枚の CAZ ディスクを 3cm 以上離して置き，一方のディスクの中心から中心までの間隔が 1.5 ～ 2cm になるように置かれたメルカプト酢酸ナトリウム（SMA）ディスク（栄研化学）とを結ぶ軸と垂直方向に CAZ の阻止円が 5mm 以上拡大したものを IMP-1 型 MBL 陽性と判定した［2，3］。

（3）MDRP：MIC が IMP ≧ 16 μg/ml，アミカシン（AMK）≧ 32 μg/ml，シプロフロキサシン（CPFX）≧ 4 μg/ml の全条件を満たすものを MDRP と判定した［2］。

（4）ESBLs 検査：*E. coli* および *K. pneumoniae* について，CLSI 基準に従い阻止円直径が CAZ ≦ 22mm，CTX ≦ 27mm，CPDX ≦ 17mm の場合 ESBLs 産生を疑い，確認検査において CAZ，CTX，CPDX ディスクのいずれかの阻止円直径よりも，クラブラン酸（CVA）添加ディスク（栄研化学）の直径が 5mm 以上拡大したものを陽性とした［7，24］。また，発色性 cephalosporin･HMRZ-86 を基質とするシカ β Ⅰテスト（関東化学）で試験紙が黄色から赤褐色に変化した株を ESBLs，MBL，プラスミド性 AmpC β-lactamase（AmpC BL）のいずれかが陽性と判定した［10］。

（5）VRE：PCR 法により Kariyama ら［13］のプライマーを用い，*VanA*，*B*，*C*，*C2/C3* を検査した。

2．*P. aeruginosa* の薬剤耐性

本菌は発熱を伴う（甚）急性乳房炎を起こし，症状はしばしば重症であり，慢性化しやすく，予後は必ずしも良くなかった。発生は散発的であったが，特定の農場で多発した。検査頭数中の0.5%から分離された。

P. aeruginosa の耐性菌の出現率を表1に示した。MIC を測定した全株とも IMP が＜8 μg/ml であり，ディスク検査を行った全株も IMP に対し感受性であったことから，全株がスクリーニング検査で MBL 陰性と判定された。また，全株が DDST で MBL 陰性であった。

また，AMK，CPFX に対して，MIC を測定した全株とも MDRP の基準値以下であり，ディスク検査を行った 100 株中 99 株が感受性，1 株が中間であり，全株とも MDRP ではないと判定された。

P. aeruginosa の薬剤感受性は一定の耐性型を示していた。PCs，第一，第二世代セフェム系（CEPs），グリコペプチド系（GPs）に対する自然耐性である。第一，第二世代 CEPs に対する耐性は，シカβⅠテストを行った 200 株は全て陰性であり，染色体性の誘導型 AmpC BL の産生によるものと考えられた。ESBLs 確認検査では 200 株中 188 株で CTX の阻止円直径が CVA 添加により 9mm 以上縮小した。これは，CVA は AmpC BL を誘導しやすく，AmpC BL が CVA などの BL 阻害薬に耐性であるためであることが知られている［24］。またクロラムフェニコール（CP），ST，カナマイ（KM）および OTC に対しても耐性率が高く，これは能動排出ポンプなどの耐性機構によると考えられた［2］。

抗緑膿菌薬剤である AGs，CAPMs，FQs においてゲンタマイシン（GM）耐性が 1 株みられたのみであり，これらの薬剤に対する獲得耐性化がみられなかった。これは農業共済制度では抗緑膿菌

表 1　*Pseudomonas aeruginosa* における耐性菌の出現状況

薬剤	微量液体希釈法		ディスク拡散法	
	供試株数	耐性株数（%）	供試株数	耐性株数（%）
ABPC	100	100（100）	100	100（100）
CEZ	100	100（100）	100	100（100）
CEPR	0		200	200（100）
CXM	100	100（100）	100	100（100）
KM	100	91（ 91）	100	99（ 99）
OTC	100	88（ 88）	100	99（ 99）
CP	100	100（100）	100	98（ 98）
ST	100	97（ 97）	100	96（ 96）
GM	100	1（ 1）	100	0
ABK	0		200	1（0.5）
AMK	100	0	100	0
IMP	100	0	100	0
ERFX	100	4（ 4）	0	
CPFX	100	0	100	0
LVFX	0		200	0
VCM	0		200	200（100）
TEIC	0		200	200（100）
CAZ	0		200	0
CTX	0		200	11（5.5）
CPDX	0		200	200（100）

ABPC：アンピシリン，CEZ：セファゾリン，CEPR：セファピリン，CXM：セフロキシム，KM：カナマイシン，OTC：オキシテトラサイクリン，CP：クロラムフェニコール，ST：スルファメトキサゾール・トリメトプリム，GM：ゲンタマイシン，ABK：アルベカシン，AMK：アミカシン，IMP：イミペネム，ERFX：エンロフロキサシン，CPFX：シプロフロキサシン，LVFX：レボフロキサシン，VCM：バンコマイシン，TEIC：テイコプラニン，CAZ：セフタジジム，CTX：セフォタキシム，CPDX：セフポドキシム

薬剤としてAGs，CAPMsおよびFQsの使用が認可されておらず，*P. aeruginosa* 性乳房炎で使用されたのはGMの適応外使用だけであることによると考えられる。

O血清型は200株中，OG：77株（38.5%），OA：35株（17.5%）OB：20株（10%），OI：16株（8%），OF：9株（4.5%），OE：8株（4%），OKとOC各7株（各3.5%），OD：1株（0.5%），OE・OF複合型：1株（0.5%），型別不能：19株（9.5%）であった。このうち後述の1農場からOG：51株，OAとOC各5株，OI：3株，その他OB，OKなど計73株が分離された。1972年に全国の牛乳房炎乳汁から分離された *P. aeruginosa* 144株のO血清型は，Honmaの分類のO6（現在のOFに相当する），O8(OG)，O1(OA)が多く，次いでO10(OI)，O4(OD)，O5(OE)，O2(OB)，O3(OC)が多かった[20]。今回の成績ではOFが少なかったが，OG，OAが多い点や分離株のO血清型の種類はほぼ一致していたことから，牛由来分離株のO血清型の種類は比較的決まっているものと推測された。ヒトでもOE，OG，OA，OIが多く[18]，牛分離株と似ている。

試験期間中に，根室地区で初めて *P. aeruginosa* 性乳房炎の集団感染が1農場で発生し，搾乳パーラー内の環境材料，飲水槽，治療後の慢性感染牛を搾乳後のミルカーおよび非臨床型乳房炎乳汁から同じ血清型の *P. aeruginosa* が分離された。この事例は治療後の多数の慢性感染分房が感染源となって牛群内の保菌圧が高まり，ミルカーを介して伝染したもので，粗飼料の品質の低下による免疫能の低下も宿主側の危険因子となった。米国でも搾乳パーラー内の乳房洗浄用の水，ホース類の *P. aeruginosa* 汚染によるアウトブレイクが起きている[8，14]。

3．*Serratia marcescens*，*Enterococcus faecium* の薬剤耐性

S. marcescens による乳房炎は軽症であったが，慢性化し再発しやすく，予後は必ずしも良くなかった。発生は散発的で，本菌の分離率は検査頭数の0.13%と低率であった。感染源は汚染した水や敷料のオガ屑であるとされている[4]。

S. marcescens の耐性菌の出現率を表2に示し

表2　*Serratia marcescens* における耐性菌の出現状況

薬剤	微量液体希釈法		ディスク拡散法	
	供試株数	耐性株数（%）	供試株数	耐性株数（%）
ABPC	50	48（ 96）	14	14（100）
CEZ	50	50（100）	14	14（100）
CEP R	0		62	62（100）
CXM	50	50（100）	14	10（71.4）
KM	50	1（ 2）	6	0
OTC	50	50（100）	14	14（100）
CP	50	5（ 10）	14	0
ST	50	0	14	1（7.1）
GM	50	0	14	0
ABK	0		64	2（3.1）
AMK	50	0	14	0
IMP	50	0	14	0
ERFX	50	0	0	
CPFX	50	0	14	0
LVFX	0		64	0
VCM	0		59	59（100）
TEIC	0		59	59（100）
CAZ	0		64	0
CTX	0		64	0
CPDX	0		64	0

た。MIC を測定した 50 株とディスク検査を行った 14 株の全 64 株とも MBL 陰性であった。そのうち 44 株について DDST を行ったが，MBL 陰性であった。

S. marcescens の薬剤感受性は一定の耐性型を示していた。特にセファゾリン（CEZ）に高度耐性であった。第一，第二世代 CEPs や ABPC に耐性を示したが，第三世代 CEPs に耐性を示した株はほとんどなく，シカβⅠテストを行った 45 株も全て陰性であったことから，染色体性の誘導型 AmpC BL の産生によるものと考えられた。ESBLs 確認検査では 45 株中 2 株で CPDX の阻止円が CVA により 18mm 以上縮小した。また CAPMs，AGs，FQs，ST に対する耐性化はみられなかった。

O 血清型は 64 株中 O6：32 株（50.0%），O5：14 株（21.9%），次いで O14：3 株（4.7%），O2，O16，O6･O16 複合型が各 2 株（3.1%），O1，O3，O8，O10 が各 1 株（1.6%），型別不能:5 株（7.8%）であった。乳牛では O6，O5 型が多く，ヒトでは施設間で差があるものの O2，O14 が優勢で，O6，O5 は少ないことが，疫学的関連性が低いものと考えられるとの報告もある［17］。

耐性 *E. faecium* による乳房炎は軽症で予後も良好であった。分離率は 0.03%と非常に低率であった。乳房炎症例での腸球菌の分離率は 2 ～ 3%と推定されている［25］。乳牛における腸球菌はヒトと同じく日和見感染で，組織侵襲性や外毒素は明らかでなく病原性は低いと考えられている［9］。

E. faecium の耐性菌の出現率を表 3 に示した。PCG，ABPC，OTC に耐性株が存在し，PCs 耐性 *E. faecium* は PC 結合蛋白の変化による耐性である［12］。供試した 9 株のうち PCR を行った 6 株

表 3　*Enterococcus faecium* における耐性菌の出現状況

薬剤	微量液体希釈法		ディスク拡散法	
	供試株数	耐性株数（%）	供試株数	耐性株数（%）
PCG	6	5（83.3）	3	3（100）
ABPC	6	6（100）	3	3（100）
CEZ	6	6（100）	3	3（100）
CEPR	6	6（100）	3	3（100）
CXM	0		9	9（100）
NFPC	6	6（100）	3	3（100）
MDIPC	6	6（100）	2	2（100）
MPIPC	0		9	9（100）
CFX	0		9	9（100）
KM	6	5（83.3）	3	3（100）
OTC	6	5（83.3）	3	3（100）
EM	6	2（33.3）	3	2（66.7）
CP	0		9	3（33.3）
ST	6	2（33.3）	3	1（33.3）
GM	0		9	4（44.4）
ABK	0		9	4（44.4）
VCM	6	0	3	0
TEIC	0		7	0
TP	6	4（66.7）	0	
TMS	6	2（33.3）	0	
OBFX	6	5（83.3）	0	
NFLX	6	判定不能	0	
CAZ	0		7	7（100）
CTX	0		7	7（100）
CPDX	0		6	6（100）

PCG：ベンジルペニシリン，NFPC：ナフシリン，MDIPC：ジクロキサシリン，MPIPC：オキサシリン，CFX：セフォキシチン，EM：エリスロマイシン，TP：チアンフェニコール，TMS：チルミコシン，OBFX：オルビフロキサシン，NFLX：ノルフロキサシン

は全て *VanA*，*B*，*C*，*C2/C3* 遺伝子を保有せず，また他の3株もバンコマイシン（VCM），テイコプラニン（TEIC）に対して感受性であり，9株ともVREではないと考えられた。

以上の成績は，国内各地のブタ，ニワトリ，肥育牛の *E. faecium*，*E. faecalis* やヒトの腸球菌の耐性率と同様の傾向であった［12，22］。今回の耐性腸球菌は全て *E. faecium* であった。ウシでは *E. faecium* が *E. faecalis* より優勢であるためと考えられた。腸球菌はグラム陽性菌のなかでも最も多剤耐性菌が多く，VCM耐性遺伝子を含むプラスミドのほか，数種の高頻度水平伝達性プラスミドが存在する。

4．*Escherichia coli*，*Klebsiella pneumoniae* および *Klebsiella ozaenae* の薬剤耐性

耐性 *E. coli* は甚急性の重症乳房炎を起こし，予後は悪かった。分離率は推定で検査頭数の0.5～1%であった。乳房炎症例での *E. coli* の分離率は5～10%と推定された。

E. coli の耐性菌の出現率を表4に示した。MICを測定した22株とディスク検査を行った6株の全28株がMBL陰性であった。そのうち24株についてDDSTを行なったが，全てMBL陰性であり，27株についてESBLs確認検査を行なったが，全て陰性であった。供試菌株はABPC，OTC，ST，KMの4剤に高度の獲得耐性であった。さらにCP，GMに加え，一部の株で第一，二世代CEPsに対して耐性であった。*E. coli* は染色体性の構成型AmpC BLを産生するが，誘導され難くCEPsに感受性である。今回のCEPs耐性は，全株がESBLs陰性であり，シカβⅠテストを行った14株が全て陰性であったことから，第一，第二世代CEPsの選択圧の上昇により，染色体性AmpC遺伝子の過剰発現株が選択されたものと推定された。

米国では子牛の下痢症から第三世代CEPs，テトラサイクリン(TC)，AGs，FQsなどに対する多剤耐性 *E. coli* が分離され，この第三世代CEPs耐性は染色体性AmpC BLの過剰発現によるか，TEM型のクラスA-BLとの共働によるもので，第三世代CEPsの使用が過剰発現株を選択させたと推測されている［5］。今回，第三世代CEPs耐性 *E. coli* はCPDXにみられた3株だけであった。以

表4　耐性 *Escherichia coli* における耐性菌の出現状況

薬剤	微量液体希釈法		ディスク拡散法	
	供試株数	耐性株数（%）	供試株数	耐性株数（%）
ABPC	22	22（100）	6	6（100）
CEZ	22	5（22.7）	6	1（16.7）
CEPR	0		27	14（51.9）
CXM	22	2（9.1）	6	1（16.7）
KM	22	19（86.4）	6	2（33.3）
OTC	22	22（100）	6	6（100）
CP	22	11（50）	6	4（66.7）
ST	22	22（100）	6	6（100）
GM	22	5（22.7）	6	2（33.3）
ABK	0		28	0
AMK	22	0	6	0
IMP	22	0	6	0
ERFX	22	0	0	
CPFX	22	0	6	0
LVFX	0		28	0
VCM	0		28	28（100）
TEIC	0		24	24（100）
CAZ	0		27	0
CTX	0		27	0
CPDX	0		27	3（11.1）

上の成績は国内各地の病牛から分離された *E. coli* の耐性化の傾向とほぼ一致したが［11］，今回の成績ではエンロフロキサシン（ERFX）耐性株は分離されていない。これはABPC，KM，OTC，STはウシの臨床で多用され選択圧を高めてきたが，ERFXはサルモネラ症以外では使用頻度が低いためと思われた。

K. pneumoniae は急性乳房炎を起こすが，全身症状は *E. coli* より軽く，予後は耐性 *E. coli* ほど悪くなかった。敷料にオガ屑を使用している農場での発生が多かった。分離率は推定で0.5～1%であった。

Klebsiella sp.の耐性菌の出現率を表5に示した。MICを測定した6株とディスク検査を行った9株の計15株がMBL陰性であった。また15株はDDSTでMBL陰性であった。ESBLs確認検査を行なった14株は全て陰性であった。

K. pneumoniae のABPC耐性率は高かった。これは *K. pneumoniae* が染色体性のクラスA-BLを産生するためである［24］。また一部の株でOTCをはじめ，CP，ST，KM，第一，第二世代CEPsに耐性化していた。*K. pneumoniae* は染色体性の誘導型AmpC BLがなく，CEPsに感受性であるが，一部の株でCEPs耐性がみられ，うち1株は *Klebsiella ozaenae* であった。全株で第三世代CEPsには耐性がみられず，シカβⅠテストは8株で陰性であり，*Klebsiella oxytoca* でみられる染色体性クラスA-BLによるCEPs耐性かもしれない。

5．乳牛の獣医臨床と多剤耐性菌の展望

近年，国内のと殺牛の糞便中やと体からCTX-M-2型（従来のToho型-1）のBL産生性 *E. coli* が分離されている［21］。ヒトでは同型の菌が抗菌剤を未投与の尿路感染症などの外来患者から散発的に分離される傾向にあり，第三世代広域スペクトラムのCEPsに高度耐性であるため，健康キャリアーの存在が推測され，ウシ由来説が提唱されている［21］。また，同型のBL産生プラスミドはKM，TCにも耐性であり，同型のBL産生 *E. coli* は国内の河川の水からも分離されている。英国でも同一農場の子牛下痢と成牛からCTX-M型

表5　*Klebsiella pneumoniae* および *Klebsiella ozaenae* における耐性菌の出現状況

薬剤	微量液体希釈法		ディスク拡散法	
	供試株数	耐性株数（%）	供試株数	耐性株数（%）
ABPC	6	5（83.3）	9	9（100）
CEZ	6	1（16.7）	9	1（11.1）
CEPR	0		15	2（13.3）
CXM	6	1（16.7）	9	0
KM	6	0	9	1（11.1）
OTC	6	2（33.3）	9	1（11.1）
CP	6	1（16.7）	9	1（11.1）
ST	6	1（16.7）	9	1（11.1）
GM	6	0	9	0
ABK	0		15	0
AMK	6	0	9	1（11.1）
IMP	6	0	9	0
ERFX	6	0	0	
CPFX	6	0	9	0
LVFX	0		15	0
VCM	0		15	15（100）
TEIC	0		10	10（100）
CAZ	0		15	0
CTX	0		14	0
CPDX	0		14	0

BLを産性し，染色体性AmpCのプロモーター領域に変異をもつ第三世代CEPs耐性の*E. coli*が分離された［16］。また米国ではCMY-2型のプラスミド性AmpC BLを産生する第三世代CEPs耐性*Salmonella*がウシ，ブタ，ヒトから分離され，CAZ，セフトリアクソンに交差耐性であったと報告されている［26］。国内のブロイラーからCTX-M型BLやCMY-2型BLの遺伝子を有し，AmpCのプロモータ領域に変異をもつ*E. coli*が分離されたが，広域CPEs使用との直接的関係はなく，環境要因との関係が推測されている［15］。米国では獣医領域の抗菌薬の規制が緩やかで，第三世代CEPsの使用と腸内細菌群の第三世代CEPs耐性の関係が疑われながら，CTX-M-2型BLは優勢ではない。日本の獣医療におけるCEPsの年間使用量は約2,000kgであり，大半が乳牛用である［23］。1990年代前半にウシで第一，二世代CEPsが認可され，大半は乳房注入薬としての使用である。また第三世代CEPsも2006年に認可されているが乳牛での適応は主に趾間腐爛で，現在までの使用量は僅かである。CTX-M型BLの生成に最初に選択圧をかけたのは，ヒト医療なのか獣医療なのか不明であるが，国内のウシにすでに浸潤している可能性がある。ウシの腸管内は耐性プラスミドの水平伝達に好適で，多剤耐性*E. coli*や*Salmonella*の保菌場所であることが指摘されている［16，21，26］。

今回報告した，各菌種の薬剤耐性の成績から，乳房炎の抗菌薬治療では，感受性のある抗菌スペクトラムの狭い旧来型抗菌薬を第一選択薬とし，特定の抗菌薬に偏らない使用法を心懸けても十分治療可能であると考えている。今後も乳牛の獣医療においては食品媒介性感染症を予防するうえで，第一，第二，第三世代CEPsやFQsなどの選択圧を高めることにより，多剤耐性菌の起源とならないよう留意したい。農業共済において乳牛では，CAPMs，ERFX以外のFQs，ストレプトマイシン，KM以外のAGs，GPsは認められていない。今回の成績においても，これらの抗菌薬に対する耐性菌は出現しておらず，今後MBL，MDRP，VREが分離される可能性は低いと思われた。

一方，国内のヒトやイヌ，ウシ，ニワトリからのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）やCTX-M-2型，CMY-2型BL産生菌の分離状況から，今後これらの監視を強化する必要がある［6，21］。多剤耐性菌の防除対策としてはサルモネラ症や黄色ブドウ球菌性乳房炎の対策を参考に，農場の早期清浄化と周辺農場への感染蔓延を阻止することに重点を置き対応したい。

謝　辞

終わりに，*P. aeruginosa*に関する貴重なご助言を頂いた国立感染症研究所荒川宜親細菌第二部長，また乳房炎起因菌検査について永年ご助言を頂いた元北海道NOSAI家畜臨床講習所長安里章博士に深謝致します。

要　約

2005年9月～2007年8月に根室支庁全域の乳牛の乳房炎乳汁から，*Pseudomonas aeruginosa* 200株，*Serratia marcescens* 64株，耐性*Enterococcus faecium* 9株，耐性*Escherichia coli* 28株，*Klebsiella pneumoniae* 14株，*Klebsiella ozaenae* 1株を分離した。それらについてCLSI標準法の微量液体希釈法とDisk法により薬剤感受性検査を行い，各菌種の耐性化の状況と，VRE，ESBLs産生菌，MBL産生菌，MDRPの分離状況を調査した。

*P. aeruginosa*ではABPC，CEZ，CXMに全株が耐性で，CP，ST，KM，OTCなどで高率に耐性であったが，IMP，アミノグリコシド系（AGs），フルオロキノロン系（FQs），CAZ，CTXなどでは低率であった。PC系，第一，第二世代セフェム系（CEPs）に対する自然耐性と考えられた。全株がMBL（基準；MICがIMP ≧ 8 μg/ml）陰性，また全株がDDSTでもMBL陰性であった。また全株がMDRP（基準；MICがIMP ≧ 16 μg/ml，AMK ≧ 32 μg/ml，CPFX ≧ 4 μg/ml）ではなかった。O抗原血清型はG，A，B，I，F，E型が多く，ヒトでの分布と近似していた。

S. marcescens 64株の耐性率はABPC，CEZ，CXM，OTCで高く，IMP，AGs，FQs，第三世代CEPs，ST，CPなどで低かった。第一世代CEPs

に対する自然耐性と考えられた。全株がMBL陰性であった。O血清型は6，5，14型が多く，ヒトでの分布と異なっていた。

耐性 *E. faecium* 9株の耐性率はPCG，ABPCや他のβ-ラクタム系，KM，OTCで高く，VCM，TEICで0%であった。PCG，ABPCに獲得耐性と考えられた。PCR検査を行った6株は *VanA*，*B*，*C*，*C2/C3* を保有しなかった。耐性 *E. coli* はABPC，OTC，ST，KMに高度の獲得耐性と考えられた。IMP，AGs，FQ，第三世代CEPsで耐性率が低かった。しかし，CP，GM，第一，第二世代CEPs，CPDXで耐性化が進みつつあった。全株がESBLs（CLSIの基準；CAZ，CTX，CPDXの阻止円直径がクラブラン酸添加により5mm以上拡大）陰性で，MBL陰性であった。

K. pneumoniae と *Klebsiella ozaenae* ではABPCの耐性率が高く，IMP，AGs，FQs，第三世代CEPsで低かった．一部の株でOTCをはじめCP，ST，第一，第二世代CEPsに耐性化していた。ESBLs確認検査では14株が陰性で，全株がMBL陰性であった。

S. marcescens，耐性 *E. faecium* は分離率が低く，また乳房炎の症状も軽症で，臨床上大きな問題点は見られなかった。緑膿菌性乳房炎は症状が重症であり，フリーストール牛群での集団発生例が見られた。

今回の供試菌株からVRE，ESBLs産生菌，MBL産生菌およびMDRPの多剤耐性菌は分離されなかったが，今後も監視を強化したい。

引用文献

1）荒川宜親：日本臨床微生物学雑誌，13，150-159（2000）

2）荒川宜親：柴田尚宏：臨床病理，特集111，100-116（2000）

3）Arakawa Y, Shibata N, Shibayama K, et al.: J Clin Microbiol, 38, 40-43 (2000)

4）Bowman GL, Hueston WD, Boner GJ, et al.: J Am Vet Med Assoc, 189, 913-915 (1986)

5）Bradford PA, Petersen PJ, et al.: J Antimicrob Chemother, 44, 607-610 (1999)

6）CDC（満田年宏訳）: CDC Guideline, Management of Multidrug-Resisatant Organisms In Healthcare Settings, 2006, 11-71, 74-87, ヴァンメディカル，東京（2006）

7）Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard—Second Edition, 13-72 (2002)

8）Erskine RJ, Unflat JG, Eberhart RJ, et al.: J Am Vet Med Assoc, 191, 811-816 (1987)

9）藤田直久，小森敏明：臨床病理，特集111，132-141（2000）

10）Hanaki H, Kubo R, Nakano T, et al.: J Antimicrob Chemother, 53, 888-889 (2004)

11）Harada K, Asai T, Kojima A, et al.: J Vet Med Sci. 67, 999-1002 (2005)

12）池　康嘉：臨床病理，特集111，26-35 (2000)

13）Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, et al.: J Clin Microbiol, 38, 3092-3095 (2000)

14）Kirk JH, Bartlett, P.C.: J Am Vet Med Assoc, 184, 671-671 (1984)

15）Kojima A, Ishii Y, et al.: Antimicrob Agents Chemother, 49, 3533-3537 (2005)

16）Leibana E, Batchelor M, Hopkins KL, et al.: J Clin Microbiol, 44, 1630-1634 (2006)

17）丸茂健治，田口和三：臨床病理．45，787-791（1997）

18）中埜茂子，他：日本化学療法学会雑誌．43，525-530（1995）

19）National Mastitis Council: Labolatory and Field Handbook on Bovine Mastitis (1987)

20）清水　健：家畜衛生週報，1257，254-255（1973）

21）Shiraki Y, Shibata N, Doi Y, et al.: Emerg Infect Dis. 10, 69-75 (2006)

22）高橋敏雄，他：感染症学雑誌，80，185-195（2006）

23）田村　豊：日獣会誌，56，685-691（2003）

24）Thomson K S: Emerg Infect Dis, 7, 333-336 (2001)

25）Todhunter DA, Smith KL, et al.: J Dairy Sci. 78, 2366-2374 (1995)

26）Winokur P. L, et al.: Antimicrob Agents Chemother, 44, 2777-2783 (2000)

Anitmicrobial Resistance of Bacterial Isolates from Bovine Mastitic Milk and Surveillance for Vancomycin Resistant Enterococci, Extended Spectrum β-Lactamases Producers, Metallo- β-Lactamase Producers and Multiple-Drug -Resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Nemuro District, Japan

Mamoru OHNISHI

Clinical Laboratory, Nemuro District Agricultural Mutual Aid Association,
11-5 Minami, 5-Joh Nishi, Nakashibetsu-cho, Shibetsu-gun, Hokkaido 086-1105, Japan

The susceptibility of 200 *Pseudomonas aeruginosa* isolates, 67 *Serratia marcescens* isolates, 9 *Enterococcus faecium* isolates, 28 *Escherichia coli* isolates, 14 *Klebsiella pneumoniae* isolates and 1 *Klebsiella ozaenae* isolate from bovine mastitic milk in Nemuro district from September 2005 to August 2007 was determined against over 20 antimicrobials by broth microdilution method and disk diffusion method, and multi-drug-resistant isolates of them were surveyed.

All *P. aeruginosa* isolates were highly resistant to ampicillin (ABPC), cefazolin (CEZ) and cefuroxime (CXM). The antimicrobial resistance rates of the isolates to chloramphenicol (CP), sulfamethoxazole・trimethoprim (ST), kanamycin (KM) and oxytetracyclin (OTC) were very high, whereas those to imipenem (IMP), aminoglycocides (AGs), fluoroquinolones (FQs), ceftazidime (CAZ) and cefotaxime (CTX) were very low. All the isolates were negative for metallo- β- lactamase (MBL) screening test (criterion MIC for IMP: 8 μg/ml) and for double disk synergy test (DDST) with CAZ and sodium mercaptoacetate. Moreover, these isolates were not multiple -drug resistant (criterion MIC for IMP: 16 μg/ml, for amikacin: 32 μg/ml, for ciprofloxacin: 4 μg/ml). The serotypes of the 200 isolates were O-G (38.5%), O-A (17.5%), O-B (10%), O-I (8%), O-F (4.5%), O-E (4%) and others.

The resistance rates of 64 *S. marcescens* isolates to ABPC, CEZ, CXM and OTC were very high, but those to IMP, AGs, FQs, 3rd-generation cephalosporins (CEPs), ST and CP were very low. All the isolates were negative for MBL screening. The serotypes of the isolates were O6 (50.0%), O5 (21.9%), O14 (4.7%) and others. The resistance rates of 9 *E. faecium* isolates to benzylpenicillin (PCG), ABPC, the other β-lactam antibiotics, KM and OTC were very high. These isolates were thought to be acquired resistant to PCG and ABPC. However, these isolates were susceptible to glycopeptides. PCR analysis demonstrated that 6 *E. faecium* isolates did not carry *VanA, VanB, VanC* and *VanC2/C3* genes.

Twenty-eight *E. coli* isolates were highly resistant to ABPC, OTC, ST and KM. The resistance rates of the isolates to IMP, AGs, FQs, 3rd-generation CEPs were low. However, those to CP, gentamicin, 1st-・2nd-generation CEPs and cefpodoxime (CPDX) have been increasing. All the isolates were negative for extended spectrum β-lactamases (ESBLs) comfirmatory tests (5mm increase in a zone diameter for either CAZ, CTX, CPDX by testing in combination with clavulanic acid), and negative for MBL screening. Fifteen *Klebsiella* sp. isolates were negative for MBL screening, and negative for ESBLs confirmatory tests.

The isolation rates of *S. marcescens* and *E. faecium* from bovine mastitic milk were low, and the clinical symptom in mastitis due to those bacteria were mild. Hence there were no major problems clinically. The clinical symptom in *P. aeruginosa* mastitis were severe. The major outbreak of *P. aeruginosa* mastitis occurred in a large free-stall herd. The multi-drug-resitant organisms were not isolated in this study. However, the surveillance of them must be strengthen.

討　論（座長：阪野哲也　科飼研，青木　宙　東京海洋大）

質問（大西　守，根室地区 NOSAI）

高度耐性菌の病院内・患者・医療従事者⇔健康人⇔愛玩動物⇔産業動物間の生態，疫学にお詳しい荒川先生にお聞きしたいのですが，今後高度耐性菌が産業動物の間で伝播・定着し，増加してくることはあるのでしょうか。

答（荒川宣親，国立感染研）

そういうことはあまり考えられない．例えば腸球菌はヒトと動物では型が違い，ヒトの耐性菌が動物に感染し動物体内に定着するとは考えにくい。

質問（藤倉孝夫）

私が JICA から派遣されたある国では，*Staphylococcus aureus*（SA）性乳房炎は多剤耐性で困っていた。またデッピングが乳房炎予防上非常に効果であったのですが。

答（大西　守）

根室地方でも SA 性乳房炎は農場単位で 7 ～ 8 割，頭数で 10%前後感染しており，起因菌のうちで，伝染性，治療抵抗性，清浄化困難性から最も重要である。農家や農協は熱心に防除対策に努力しているが，あまり効果は上がっていない。その大きな要因は潜在性感染牛が非感染牛に混ざり搾乳され，SA がミルカーを介して伝播されていくからである。乳房清拭の一頭一布やデッピングは効果が大きいが，ミルカーを介した SA の伝播にはあまり効果はない。また SA の耐性化は PCG や ABPC に対する β-lactamase による耐性ぐらいであまり進んでいない。その一つの要因として，SA 感染牛は 3 ～ 4 産ぐらいで淘汰され，長期間牛群にいないこと，抗生剤の種類が制限されていること，治療期間があまり長期にわたらないことなどが考えられる。

質問（岡野圭介，シェリングプラウアニマルヘルス）

Aspergillus，酵母また *Klebsiella* による乳房炎についてはいかがですか。

答（大西　守）

Aspergillus はあまり分離した経験がありません。その原因の一つに培養を 18 ～ 42 時間しか行っていないことがあるのかも知れません。また牛の粗飼料がサイレージ主体になり，以前のようにあまりかびた乾草を給与しなくなったからではないでしょうか。

酵母性乳房炎はかなり発生率が高く（数%），*Candida* によるものが主体である。症状は軽く微熱はあるが，食欲はあまり落ちないのが特徴です。大腸菌性乳房炎とともに症状に特徴があり，経験を積んだ獣医師は初診時にほぼ診断可能です。ナイスタチンは副作用が強く，イソジンの静注や乳房内注入，頻回搾乳で治療し，予後は良好です。

最近，*Klebsiella* による乳房炎が 1 農場で多発し，敷料のオガ屑を廃棄し新しいものにしたらその後 1 頭も発生しなくなりました。検査室は感染制御の役割を担っているので，診療獣医師と緊密に感染症の情報交換を行っている。平成になり再興・新興感染症が増加しており，産業動物獣医師は感染症に対する力量が問われている。

質問（大西　守）

以前，乳房炎乳から *S.agalactiae* とは異なった，見慣れない β 溶血性連鎖球菌を純培で分離したことがあります。菌名は忘れたが，同定を依頼した先生によると魚の連鎖球菌であると言われました。どの様な菌が考えられますか。35℃ で培養しました。

答（片岡　康，日獣大）

おそらく，*Streptococcus dysgalactiae* D だと考えられます。