

全国農業共済協会会長賞

岡山県内酪農場における 使用前敷料からの 大腸菌群分離と乳房炎発生状況

ひさだ のぶ 久田 野歩 柄 武志¹⁾
尾崎 弘一¹⁾ 村瀬 敏之¹⁾

NOSAI 岡山 乳房炎分科会

¹⁾ 鳥取大学 農学部

(〒704-8126 岡山市東区西大寺浜 915-1)

(E-mail: hisada_n@ok-nosai.or.jp)

要 約

大腸菌群は、乳牛に重篤な乳房炎を起こす原因菌である。今回、岡山県内酪農場で牛床に用いられる敷料の使用前のオガクズおよびモミガラから、大腸菌群の*Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) と *Escherichia coli* (*E. coli*) の分離を行い、乳房炎発生状況や薬剤耐性との関連を調査した。*K. pneumoniae*の検出率はオガクズに比べモミガラが高率 ($P<0.01$) であり、*E. coli*の検出率はオガクズに比べモミガラが低率 ($P<0.01$) であった。夏季の*K. pneumoniae*の分離は他の季節より高率 ($P<0.01$) であった。*K. pneumoniae*が検出された敷料使用の乳牛では、乳房炎発生率と死産率が非検出敷料使用の乳牛に比べ有意 ($P<0.01$) に高かった。Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) 産生を疑う薬剤耐性株が使用前敷料から分離され、公衆衛生上問題となる可能性が示唆された。

【キーワード：ESBL産生、*K. pneumoniae*、乳房炎、敷料】

..... 家畜診療, 63, 415-420(2016)

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) は乳牛に重篤な乳房炎を起こす原因菌で、牛床の敷料に用いるオガクズに使用前から存在するとの報告がある¹⁾。

*K. pneumoniae*による乳房炎は夏季の発生が多く、敷料管理の重要性が指摘されている²⁾。岡山県内で牛床に使用している敷料はオガクズ以外にモミガラ

も多く、同様に *K. pneumoniae* が原因となる乳房炎の問題に悩まされている。そこで、使用前の敷料(オガクズおよびモミガラ)から大腸菌群 (*K. pneumoniae* および *E. coli*) を分離し、各農場の乳房炎発生状況との関連について調査した。

近年、薬剤耐性関連遺伝子を有する様々な菌種が報告されており、Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL) もその一つである。ESBLは、基質特異性拡張型 β ラクタマーゼの一群であり、 β ラクタム薬を特異的に分解する酵素として知られている。ESBLは国内外の様々な領域で分離が報告され、国内でも乳房炎に罹患した乳汁からの検出報告もある³⁻⁵⁾。また、*K. pneumoniae*は臨床・検査標準協会 (Clinical Laboratory Standard Institute ; CLSI) の指針により、ESBL産生株のスクリーニングおよび確認試験の対象菌として指定されている⁶⁾。今回、敷料から分離された *K. pneumoniae* を用いてESBL産生株のスクリーニング検査を実施し、薬剤耐性について調査した。

材料および方法

採材は、平成26年1月(冬季)、4月(春季)、8月(夏季)、11月(秋季)の4回、県内56戸の酪農場で行い、使用前の敷料延べ239検体(オガクズ218検体、モミガラ21検体)の細菌検査を行った。オガクズおよびモミガラは、採材後直ちに密閉し冷蔵にて保存し、鳥取大学に送付した。細菌検査は、クロモカルト培地を用いて *E. coli* を分離、*K. pneumoniae* はMCIC培地を用いて分離後、アピS(シスメックス株)にて同定した。分離した *K. pneumoniae* はCLSI指針を参考に、ESBL産生株のスクリーニング検査を行った^{7, 8)}。スクリーニング検査はミューラーヒントン寒天培地を用い、ESBL産生菌のスクリーニング用薬剤としてセフトジジム (CAZ)、セフトリアキソン (CTRX)、セフォタキシム (CTX)、セフボドキシム (CPDX)、アズトレオナム (AZT) の5剤で

表1 敷料別大腸菌群検出率

	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
総検体	33.0% (79/239)	24.2% (58/239)
オガクズ	31.1% ^a (68/218)	25.6% ^c (56/218)
モミガラ	52.3% ^b (11/21)	9.5% ^d (2/21)

a-b,c-d間: $p < 0.01$ (χ^2 検定)

ディスク法を行った。

乳房炎延べ発生数、死廃数および成乳牛飼養頭数の調査は、56戸の農場の平成26年家畜共済診療簿および家畜共済引受台帳を用いた。乳房炎延べ発生数、死廃数、成乳牛飼養頭数は敷料の採材を行った季節ごとに、冬季が1-3月、以下、春季4-6月、夏季7-9月、秋季10-12月とし調査した(延べ14,940頭)。敷料中から *K. pneumoniae* が検出されたか否かにより、乳房炎の発生率と死廃率を比べた。

統計解析は、2種類の敷料および季節間における大腸菌群検出の比較を χ^2 検定で行った。乳房炎発生率(延べ乳房炎発生頭数/成乳牛飼養頭数)、死廃率(乳房炎死廃頭数/成乳牛飼養頭数)は、各農場における *K. pneumoniae* 検出および非検出時期の比較を χ^2 検定で行った。

結 果

敷料別の大腸菌群検出率

K. pneumoniae は敷料239検体中79検体(33.0%)から検出され、オガクズが218検体中68検体(31.1%)、モミガラが21検体中11検体(52.3%)から検出され、オガクズの検出率はモミガラの検出率に比べ有意に($P < 0.01$)に低かった。*E. coli* は239検体中58検体(24.2%)から検出され、オガクズが218検体中56検体(25.6%)、モミガラが21検体中2検体(9.5%)から検出されオガクズの検出率は、モミガラの検出率に

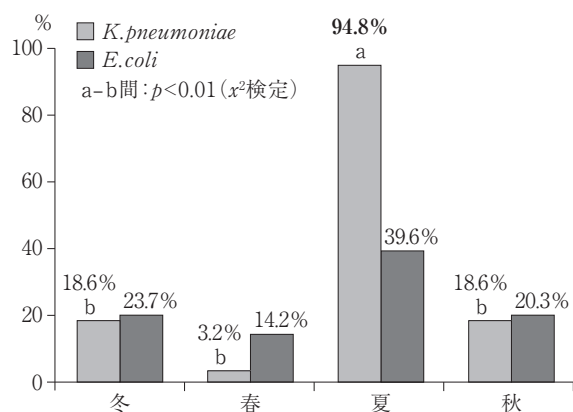


図1 季節別の大腸菌群検出率

表2 敷料の*K.pneumoniae*検出別、乳房炎発生率と死廃率

	発生率	死廃率
検出 (4,567頭)	7.77% ^a (355/4,567)	0.68% ^c (31/4,567)
非検出 (10,373頭)	5.88% ^b (610/10,373)	0.33% ^d (34/10,373)

a-b,c-d間: $p < 0.01$ (χ^2 検定)

表3 *K.pneumoniae* のESBL産生株のスクリーニング検査成績

	時期	敷料	薬剤耐性	CAZ	CTRX	CTX	CPDX	AZT
No.1	冬季	オガクズ	3種耐性	S	R	S	R	R
No.2	冬季	オガクズ	4種耐性	R	R	I	R	R
No.3	春季	モミガラ	3種耐性	S	R	I	R	R
No.4	秋季	モミガラ	4種耐性	S	R	R	R	R

比べ有意($p < 0.01$)に高かった(表1)。

季節別の大腸菌群検出率

季節別の*K. pneumoniae*の検出は、冬季が59検体中11検体(18.6%)、春季が63検体中2検体(3.2%)、夏季が58検体中55検体(94.8%)、秋季が59検体中11検体(18.6%)であった。*K. pneumoniae*の検出率は夏季が、冬季、春季、秋季に比べ有意($p < 0.01$)に高かった。*E. coli*は冬季が59検体中14検体(23.7%)、春季が63検体中9検体(14.2%)、夏季が58検体中23検体(39.6%)、秋季が59検体中12検体(20.3%)から分離された。*E. coli*検出率は夏季に高い傾向にあったが、有意差をみなかった(図1)。

*K. pneumoniae*検出別の乳房炎発生率、死廃率

*K. pneumoniae*検出敷料は乳房炎発生率が7.77

% (355/4,567頭)であり、非検出時の発生率5.88% (610/10,373頭)より有意($p < 0.01$)に高く、死廃率も検出時0.68% (31/4,567頭)、非検出時0.33% (34/10,373頭)で有意差($p < 0.01$)がみられた(表2)。

*K. pneumoniae*のESBL産生株のスクリーニング検査

敷料から分離された*K. pneumoniae*の5剤(CAZ, CTRX, CTX, CPDX, AZT)の薬剤感受性試験では79検体中4検体(5.06%)に耐性がみられた。これらの*K. pneumoniae*4株は他の β -ラクタム系薬剤であるアンピシリンやセファゾリンにも同様に耐性がみられた。薬剤耐性株は季節や敷料の種類に一定の傾向をみなかった(表3)。

考 察

モミガラの*K. pneumoniae*検出率は、オガクズの検出率に比べ高率で、牛床の敷料として用いる場合、オガクズ以上に乳房炎発症の危険性を認識して使用する必要があると考えられた。このことは頻繁に搬入するオガクズと比較して、モミガラは秋季から冬季にかけての年間1回の搬入であり、より菌の増殖の危険性が高いことが考えられた。*K. pneumoniae*は多くの敷料から分離され、敷料中*K. pneumoniae*の存在は、乳房炎発生率と死廃率が高く、乳房炎の発症に関与していることが認識された。

*E. coli*や*K. pneumoniae*による乳房炎は夏季における増加が知られており、今回も他の報告と同様であった¹⁾。暑熱ストレスは採食量低下、免疫能の低下をもたらし、夏季の*E. coli*、*K. pneumoniae*による乳房炎発生増加の要因である。また、乾乳期から泌乳期にかけての移行期はボディ・コンディションスコアの変化、泌乳ストレスによる免疫力の低下をもたらし、甚急性乳房炎が分娩直後から泌乳最盛期にかけて多発するとの報告もある²⁾。そこで、夏季や移行期は種々なストレス対策として飼養管理の改善が必要となる。しかし、乳房炎の予防上最も重要となるのが原因菌の除去であり、夏季の敷料中の細菌増殖への対策が重要となる。対策としては消石灰を敷料に対して2～5%混合が有用との報告があり¹⁾、高リスクの夏季は、消石灰の混合割合も考慮する必要があると考えられる。対策は敷料の特性を踏まえ、さらなる検討が必要と考えられる。

今回、使用前敷料から検出された*K. pneumoniae*に、ESBL産生を疑う多剤耐性株が存在していた。このことは多剤耐性菌が畜産現場以前の環境中に存在している可能性が示唆された。近年、医療や獣医療領域における薬剤耐性は大きな問題であり、食用動物の抗菌剤使用が人医療へ影響することも危惧されている。2003年12月にFAO(国際連合食糧農業機

関)/OIE(国際獣疫事務局)/WHO(世界保健機関)の合同専門会議で科学的な評価が行われ、「人以外での抗菌性物質の使用に起因する耐性菌が、人の健康に悪影響を与える明らかな証拠がある」と結論づけられ、食用動物における抗菌性物質の慎重使用は国際的な共通認識となっている^{9, 10)}。特に第3・第4世代セファロスポリンおよびフルオロキノロンは人医療と獣医療ともに最重要な抗生物質であり、慎重な使用が求められている¹¹⁾。

また、乳房炎に罹患した乳汁から分離された*K. pneumoniae*にESBL産生株の存在が報告²⁾されており、家畜における耐性菌の出現と拡散は、さらなる警戒を必要としている。産業動物臨床の獣医師はこのことを念頭に診療することが必要であり、乳房炎に対峙した際に原因菌を究明することは必須である。抗菌剤の使用は細菌学的特徴を考慮し、必要最小限の抗菌剤で治療しなければならない。農場での耐性菌発現のリスクを減らすためと、乳房炎による経済損失を抑える意味からも、抗菌剤の使用頻度を減らす努力が必要と考えられる。さらに、農場内での乳房炎予防の取り組みが、抗菌剤の使用頻度を減じ、農場の経営向上に、最重要であると考えられた。

引用文献

- 1) 永幡肇：家畜共済の診療指針Ⅱ，229，249-250，全国農業共済協会(2003)
- 2) 河合一洋：牛の乳房炎治療ガイドライン，動物用抗菌薬研究会編，19-20，33，45-46，92-94，緑書房，東京(2015)
- 3) Hiroi M, Yamazaki F, Harada T, *et al.* : Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in food-producing animals, J Vet Med Sci, 74, 189-195(2012)
- 4) Ohnishi M, Okatani AT, Harada K, *et al.* : Genetic characteristics of CTX-M-type extended-

spectrum- β -lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae involved in Mastitis cases in Japanese dairy farms, 2007 to 2011, J Clin Microbiol, 3117-3122(2013)

5) Ghafourian S, Bin Sekawi Z, Sadeghifard N, *et al.* : The prevalence of ESBLs producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in some major hospitals, Iran , Open Microbiol J, 5, 91-95(2011)

6) 大西守, 澤田拓士, 原田和記他 : CTX-M-2 型 β -ラクタマーゼ産生 *Klebsiella pneumoniae* による牛乳房炎の発生, 獣医疫学雑誌, 16, 142-147 (2012)

7) Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) : performance Standards for Anitimicrobial

Susceptibility 15 Infomational Supplement, M100-S15(2005)

8) 岩田健太郎, 宮入烈 : 抗菌薬の考え方, 使い方, 101-105, 中外医学舎(2013)

9) Seiffert SN, Hilty M, Perreten V, *et al.* : Extended-spectrum cephalosporin-resistant Gram-negative organisms in livestock, an emerging problem for human health?, Drug Resistance Updates, 16, 22-45(2013)

10) 浅井哲夫 : 家畜における薬剤耐性菌の現状, 獣医畜産新報, 63, 712-713(2010)

11) 石橋朋子 : 国際獣疫事務局 (OIE) における薬剤耐性菌に対する取り組み, 獣畜新報, 68, 88-89 (2015)

Isolation of coliform group from unused litter and occurrence of mastitis
at dairy farms in Okayama Prefecture

Nobu Hisada, Takeshi Tsuka¹⁾
Hiroichi Ozaki¹⁾, Toshiyuki Murase¹⁾

Sectional meeting of Mastitis, Okayama A.M.A.A.

¹⁾ Faculty of Agriculture, Tottori University

(915-1 Hama, Saidaiji, Higashi-ku, Okayama, Okayama 704-8126)

SUMMARY

Coliform bacteria are pathogens causing severe mastitis in dairy cattle. At dairy farms in Okayama Prefecture, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) and *Escherichia coli* (*E. coli*) were isolated from sawdust and chaff in unused litters for cattle beddings and the relationship of the coliform groups with the occurrence of mastitis and drug resistance was investigated. The detection rate of *K. pneumoniae* was higher in chaff than sawdust ($P < 0.01$), whereas the rate of *E. coli* was lower ($P < 0.01$). *K. pneumoniae* isolation was the highest in summer ($P < 0.01$). Dairy cattle using litters from which *K. pneumoniae* was detected showed significant high mastitis incidence and mortality ($P < 0.01$) compared to those using litters with these two bacteria being undetected. Drug-resistant strains suggestive of extended spectrum β -lactamase (ESBL) production were isolated from unused litters, posing a risk of public health problem.

【Keywords: ESBL production, *K. pneumoniae*, mastitis, litter】

.....J Livestock Med, 63, 415 - 420 (2016)