

総 説

牛呼吸器主要原因菌 *Mannheimia haemolytica* の 薬剤感受性について

勝田 賢

農研機構動物衛生研究所環境 常在疾病研究チーム

(〒039-2586 青森県上北郡七戸町海内31)

TEL 0176-62-5115,

Fax. 0176-62-5117

E-mail: katsuda@affrc.go.jp

【はじめに】

わが国においては、1970年代に始まった乳用雄牛の集団飼育を嚆矢として、最近では乳用・肉用牛ともに多頭飼育が進展している。1960年代と比較すると1戸あたりの飼養頭数が6倍以上になり、飼育規模が1000頭を超える農場も認められる。多頭飼育下において、呼吸器病は生産性を阻害する大きな要因となっており(図1)、家畜共済統計によれば呼吸器病による死廃事故・病傷事故頭数は、ここ数年増加傾向にある(図2)。わが国の畜産業において牛の呼吸器病による死廃事故の被害額は、少なく見積もっても肉牛生産規模全体の2%にあたる200億円にもなると言われており、これに呼吸器病罹患牛の発育遅延・飼料効率の低下、肉質の低下、繁殖適用遅延等の間接的被害を加えると被害額は莫大なものになると考えられる。



図1 飼育形態の大型化・集約化と疾病との関係

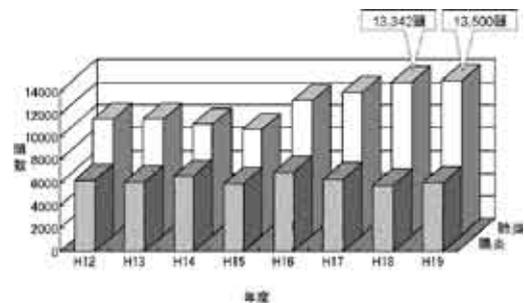


図2 肉用牛の死廃事故（肺炎と腸炎）の推移

呼吸器病発症牛では、ウイルス、細菌、マイコプラズマ等の複数の病原体の関与が疑われる混合感染の様相を呈することが多く、これら病原体同士による相加・相乗作用が病変の悪化に関与していると考えられる。牛の呼吸器病ではウイルスやマイコプラズマの感染が第一次的要因となり、細菌等の二次感染によりさらに症状が悪化すると推定される。通常、気道に侵入した異物や病原体は粘膜上皮の線毛運動により体外に排除されている。健康牛に *Mannheimia haemolytica* を単独で噴霧感染させた場合、感染後4時間で感染細菌の約90%が線毛運動により体外に排除されることが報告されている[13]。しかし、ウイルスやマイコプラズマが呼吸器の粘膜上皮細胞に感染すると、線毛運動による異物除去作用が阻害され、結果として下部気道における細菌感染が起こりやすい状態になる。このように呼吸器症状の悪化には細菌が大きく関与しているため、呼吸器病の治療や予防

には抗菌性物質が使用される。抗菌性物質の使用は、薬剤耐性菌の選択・増加を引き起こす要因であることは周知のことである。薬剤耐性は抗菌性物質の有効性に影響を及ぼし、臨床現場での治療効果を低下させる。また、家畜で出現した薬剤耐性菌が食品を介して人の健康へ悪影響を及ぼすことが懸念されている。呼吸器病の原因微生物の薬剤感受性動態を調査することは、抗菌性物質の一次選択を行う上で極めて重要な情報となると考えられる。牛の呼吸器病に関与する細菌として、*M. haemolytica*、*Pasteurella multocida*、*P. (Bibersteinia) trehalosi*、*Histophilus somni*、*Arcanobacterium pyogenes*、*Streptococcus sp*などが挙げられる。我が国においても肺炎罹患牛の多くから*P. multocida*、*M. haemolytica*、*H. somni*が分離されており、これらの細菌が牛の呼吸器病の主要原因菌であると考えられる。理由は不明であるが、一般的に*M. haemolytica*は、*P. multocida*や*H. somni*に比較して薬剤耐性率が高い傾向にある[11]。わが国でも、小池らが栃木県で分離した*M. haemolytica*と*P. multocida*の薬剤感受性を比較して*M. haemolytica*の薬剤耐性率が高いことを報告している[12]。このため我々は、牛呼吸器病原因菌の内、*M. haemolytica*に注目し、本菌の薬剤感受性を最小発育阻止濃度により測定した。今回のシンポジウムでは1991年から2010年に分離された*M. haemolytica*の薬剤感受性成績についてその概要を報告する。

[薬剤感受性]

薬剤感受性試験には、アンピシリン(ABPC)、アモキシシリン(AMPC)、ストレプトマイシン(SM)、カナマイシン(KM)、オキシテトラサイクリン(OTC)、ドキシサイクリン(DOXY)、コロリスチン(CL)、チアンフェニコール(TP)、クロラムフェニコール(CP)、フロルフエニコール(FF)、ナリジクス酸 (NA)、ダノフロキサシン

(DNFX)およびエンロフロキサシン(ERFX)、セファゾリン(CEZ)、セフトリオラム(CTF)、セフキノム(CQN)、ホスホマイシン(FOM) の17薬剤を用いた。1991年から2010年に呼吸器病罹患牛から分離された *M. haemolytica* 358株の最小発育阻止濃度をCLSIガイドライン (M31-A3) に基づき寒天平板希釈法により測定した[6]。

表 1 *Mannheimia haemolytica* の薬剤感受性について

薬剤名	MIC range (μg/ml)	MIC ₅₀ (μg/ml)	MIC ₉₀ (μg/ml)	耐性菌株数 (%)
OTC	0.25-128.0	1.0	32.0	78 (21.8)
DOXY	≤0.125-64.0	1.0	32.0	67 (18.7)
TP	0.5->512.0	1.0	256.0	66 (18.4)
CP	0.25-64.0	1.0	32.0	62 (17.3)
FF	0.5-32.0	1.0	2.0	1 (0.3)
SM	2.0->512.0	16.0	>512.0	145 (40.5)
KM	1.0->512.0	8.0	>512.0	65 (18.2)
NA	0.5-256.0	4.0	256.0	132 (36.9)
ERFX	≤0.125-16.0	≤0.125	1.0	38 (10.6)
DNFX	≤0.125-32.0	≤0.125	2.0	38 (10.6)
CL	0.125-2.0	0.25	0.5	0 (0.0)
ABPC	≤0.125->512.0	2.0	256.0	84 (23.5)
AMPC	≤0.125-512.0	0.25	128.0	65 (18.2)
CEZ	≤0.125-16.0	2.0	4.0	0 (0.0)
CTF	≤0.125	≤0.125	≤0.125	0 (0.0)
CQN	<0.125	<0.125	<0.125	0 (0.0)
FOM	≤0.125-32.0	0.25	4.0	29 (8.1)

OTCには78株(21.8%)、DOXYには67株(18.7%)、TPには66株(18.4%)、CPには62株(17.3%)、SMには145株(40.5%)、KMには65株(18.2%)、ABPCには84株(23.5%)、AMPCには65株(18.2%)、FOMには29株(8.1%)、NAには、132株(36.9%)、ENFXとDNFXにはそれぞれ38株(10.6%)の薬剤耐性株が認められた。一方、FFには1株(0.3%)、CLとセフェム系薬剤(CEZ、CTF、CQN)には耐性株は認められず、in vitroにおいて高い感受性が認められた。(表1)。

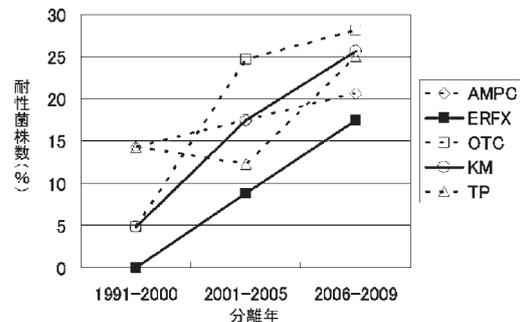


図 3 *Mannheimia haemolytica* の薬剤耐性株の推移

家畜の調査では、使用量の多い抗菌性物質に対する耐性菌が多く認められる傾向にあることが報告されている。国内の動物用抗菌性物質の販売量は純末換算で年間約1,000ト (2000-2001年調査) であり、畜種別では豚が最も多く約54%、水産用約22%、鶏用約16%で牛用は約8% (約100ト) と最も少ない。薬剤の系統別ではテトラサイクリン系が約43%と最も多く、スルホンアミド系約16%、マクロライド系約15%、ペニシリン系約10%、アミノグルコシド系約6%と報告されている[16]。牛の呼吸器感染症に承認のある抗菌性物質においても、テトラサイクリン系の販売量が約10トと最も多く、次いでサルファ剤とペニシリン系がそれぞれ6ト程度使用されている[17]。販売量の多い薬剤の耐性率は高い傾向にはあるが、フルオロキノロン系 (ERFX、DNFX) のように販売量の少ない薬剤においても10%程度の耐性菌が認められた。

次にOTC、KM、TP、AMPCおよびENFXの耐性株数の割合を年代別に比較した。(図3)。いずれの薬剤においても2001年以降の分離株は、それ以前の分離株と比較して薬剤耐性株の出現頻度が増加しており、特に、KMやOTCでは1991-2000年には5%程度であった耐性株数が、2006-2010年では25%以上に増加している。また、ENFXは1991-2000年には耐性株が認められなかったが、その後直線的に増加し、2006-2010年では約17%の株がENFXに耐性を示している。海外でも本菌の耐性化が問題となっており、1990年と1996年に分離された株を比較するとペニシリンに感受性を示す株が89%から45%、テトラサイクリンが91%から67%、ストレプトマイシンが62%から21%、ゲンタマイシンが81%から49%と感受性の低下が認められている[11]

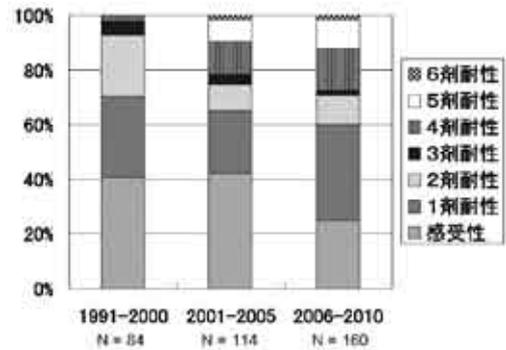


図4 系統別薬剤感受性と分離年

系統別薬剤感受性パターンを分離年毎に比較すると(図4)、2000年までに分離された84株は、約40%の株が供試した全ての薬剤に感受性を示し、約30%の株が単剤耐性を示し、2系統以上の薬剤に耐性を示す株は30%程度であった。2001-2005年に分離された114株においても、約40%の株が供試した全ての薬剤に感受性を示したが、単剤耐性を示す株の割合が減少し、2系統以上の薬剤に耐性を示す株が35%程度認められた。2006-2010年分離株では、全ての薬剤に感受性を示す株の割合が25%に減少し、40%の株が2系統以上の薬剤に耐性を示した。また、2001年以降の分離株では、6系統の薬剤に耐性を示す株が10%以上認められるようになっており、本菌の多剤耐性化が懸念される。

[*M. haemolytica*の血清型]

*M. haemolytica*は、グラム陰性、 $0.2\mu\text{m} \times 1.0-2.0\mu\text{m}$ の通性嫌気性短桿菌である。非運動性で芽胞形成能はない。カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性で糖を発酵的に分解する。羊血液寒天培地で溶血性を示し、MacConkey Agarで発育する。*M. haemolytica*は、莢膜の抗原性により12種類の血清型に分類されている[3, 5, 8]。従来、血清型1型が本菌の主流血清型として考えられており、肺病変部から分離される50-60%が血清型1型に属することが報告されていた。近年、血清型6型の分離例が増加していることが報告されている[2, 15]。

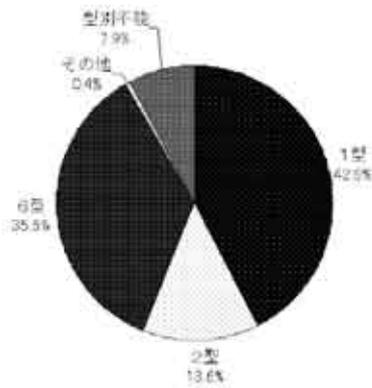


図5 M. haemolytica の血清型について

わが国で1984年以降に分離されたM. haemolyticaの血清型を間接赤血球凝集反応により調査したところ、血清型1型菌が41.4%、血清型2型菌が19.4%、血清型6型菌が28.4%であり、約90%の菌株がこの3種類の血清型に分類された(図5)。血清型6型については、1993年に確認されて以降、分離割合が増加しており、2003年以降では40%以上の株が本血清型に分類される(表3)[9]。

一方、わが国で、販売されているワクチンは、血清型1型の予防を対象にしている。異なる血清型へのワクチン効果については報告がなく不明であるが、細菌学的な知見によれば、ワクチンの主成分の一つであるロイコトキシンは、異なる血清型間においても交差反応が認められることが報告されており、また、血清型1型と6型のロイコトキシンは、遺伝的にも近縁であることが報告されている[7]。このため、ある程度の交差防御効果が認められると推察されるが、実際の効果については、感染試験等により実証する必要があると考えられる。

表3 M. haemolytica の血清型の推移

分離年	菌株数					菌株数
	血清型1	血清型2	血清型6	その他	型別不能	
1991-1992	6	5	0	0	1	12
1993-1994	9	7	1	1	4	22
1995-1996	9	5	2	0	1	17
1997-1998	14	4	4	0	0	22
1999-2000	4	1	3	0	3	11
2001-2002	5	1	5	0	0	11
2003-2004	26	16	50	0	1	93
2005-2006	37	10	28	1	7	83
2007-2008	80	17	75	0	12	184
2009-2010	20	1	7	0	1	29

[薬剤感受性と血清型]

M. haemolyticaの薬剤感受性と血清型との関係を図6に示した。血清型1型の161株中69株(42.9%)は供試薬剤全てに感受性であり、47株(29.2%)は単剤耐性であった。血清型2型55株についても45株(81.8%)が感受性もしくは単剤耐性であり、多剤耐性を示す株の割合は少なかった。一方、血清型6型122株では、供試薬剤全てに感受性を示した株は9株(7.4%)、単剤耐性株は41株(33.6%)であり、残り72株(59.0%)が2系統以上の薬剤に耐性を示し、内、51株(41.8%)が4系統以上の薬剤に耐性を示し、血清型6型に分類される菌については、他の血清型に比較して薬剤耐性菌の分離割合が高く、また、多剤耐性を示す株の割合も高い傾向にあることが明らかとなった。抗菌剤別に解析すると、フルオロキノロン(ERFX、DNFX)以外の薬剤では、血清型に関係なく耐性株が認められたが、フルオロキノロン耐性を示す38株は全て血清型6型に分類された。また、フルオロキノロンに耐性を示す菌株は、FFを除くクロラムフェニコール系(CP、TP)、アミノグルコシド系(KM、SM)、テトラサイクリン系(OTC、DOXY)薬剤にも耐性を示し、ペニシリン系(ABPC、AMPC)やFOMにも耐性を示す株も認められた(表4)[10]。

M. haemolyticaの薬剤感受性と血清型との関係については詳細な報告はないが、

Salmonella enterica や *Actinobacillus pleuropneumoniae* などでは血清型間で薬剤感受性や耐性パターンに差が認められることが報告されている[1, 4, 14]。わが国で2000年以降に血清型6型の分離割合が増加しているが、薬剤の選択圧によって多剤耐性の割合が高い血清型6型が生存し、分離割合が増加してきたと推察される。

【ワクチンか抗菌剤か】

今回のシンポジウムは「呼吸器感染症から子牛を守る－ワクチンか抗菌剤か－」がテーマである。

牛の呼吸器病は、牛呼吸器病症候群や牛呼吸器複合病 (Bovine Respiratory Disease Complex: BRDC) とも呼ばれ、

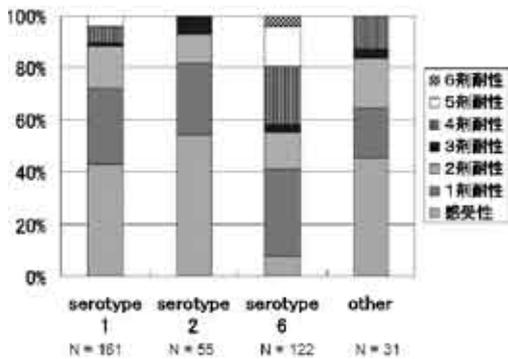


図6 血清型と系統別薬剤感受性について

ウイルス、マイコプラズマ、細菌など様々な病原体に加え、輸送等飼育環境から受ける環境ストレスや牛の免疫状態など多様な要因が関与し、宿主の抵抗性と各種病原因子とのバランスが崩れた時に発生する。発症牛に対して感受性のある抗菌剤による治療を行うことは、牛群における呼吸器病の被害を最小限に食い止めるうえで有効な手段と考えられる。しかし、呼吸器病に罹患歴のある牛では、増体率や肉質の低下が認められる。このため、呼吸器病対策に於いては予防を第一に考えることが重要である。呼吸器病の防除にあたっては、飼育環境の改善や牛の生理などを考慮し、また、ワクチンにより

個々の病原因子をコントロールするなど総合的な対策が必要である。

表4 フルオロキノロン耐性 *M.haemolytica* の薬剤耐性パターン

耐性薬剤名	株数
(NA + ERFX + DNFX) + TP + CP + SM + KM + OTC + FOM	7
(NA + ERFX + DNFX) + TP + CP + SM + KM + OTC + ABPC + AMPC	4
(NA + ERFX + DNFX) + TP + CP + SM + KM + OTC + ABPC	2
(NA + ERFX + DNFX) + TP + CP + SM + KM + OTC + DOXY	25

【おわりに】

抗菌性物質が使用されはじめた頃、劇的な効果が認められ、結核、肺炎、腸炎などの感染症による死亡率が激減した。獣医領域においても感染症の制圧や畜産物の安定的供給に大きく寄与してきたと考えられる。しかし、現在、食用動物に対する抗菌性物質の使用についてはさまざまな議論がなされ、抗菌性物質の「責任ある慎重使用」という概念が提唱されている。今後も抗菌性物質を使い続けるためには、獣医師は抗菌性物質の責任ある慎重使用に努めていく必要がある。

【参考文献】

1. Alam, M. J., Renter, D., Taylor, E., Mina, D. Moxley, R. and Smith, D. 2009. Antimicrobial susceptibility profiles of *Salmonella enterica* serotypes recovered from pens of commercial feedlot cattle using different types of composite samples. *Curr. Microbiol.* 58:354-359.
2. Al-Ghamdi, G. M., Ames, T. R., Baker, J. C., Walker, R., Chase, C. C., Frank, G. H. and Maheswaran, S. K. 2000. Serotyping of *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica* isolates from the upper Midwest United States. *J. Vet. Diagn. Invest.* 12:576-578.

3. Angen, O., Mutters, R., Caugant, D. A., Olsen, J. E., and Bisgaard, M. 1999. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J. Syst. Bacteriol. 49 Pt 1:67-86.
4. Asawa, T., Kobayashi, H., Mitani, K., Ito, N. and Morozumi, T. 1995. Serotypes and antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from piglets with pleuropneumonia. J. Vet. Med. Sci. 57:757-759.
5. Biberstein, E. L. 1978. Biotyping and serotyping of *Pasteurella haemolytica*. Academic Press, London.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute/NCCLS: CLSI/NCCLS Document M31-A3 2008. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; Approved standard-Third edition. CLSI/NCCLS document M31-A3, Wayne, PA, USA.
7. Davies, R. L., Campbell, S. and Whittam, T. S. 2002. Mosaic structure and molecular evolution of the leukotoxin operon (lktCABD) in *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *Mannheimia glucosida*, and *Pasteurella trehalosi*. J. Bacteriol. 184:266-277.
8. Fodor, L. and Donachie, W. 1988. ELISA for the measurement of sheep antibodies to the capsular antigens of *Pasteurella haemolytica* serotypes. Res Vet Sci 45:414-415.
9. Katsuda, K., Kamiyama, M., Kohmoto, M., Kawashima, K., Tsunemitsu, H. and Eguchi, M. 2008. Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987-2006. Vet. J.178:146-148.
10. Katsuda, K., Kohmoto, M., Mikami, O. and Uchida, I. 2009. Antimicrobial resistance and genetic characterization of fluoroquinolone-resistant *Mannheimia haemolytica* isolates from cattle with bovine pneumonia. Vet. Microbiol. 139:74-79.
11. Kehrenberg, C., Schulze-Tanzil, G., Martel, J. L., Chaslus-Dancla, E. and Schwarz, S. 2001. Antimicrobial resistance in *Pasteurella* and *Mannheimia*: epidemiology and genetic basis. Vet. Res. 32:323-339.
12. Koike, S., Inoue, K., Yoneyama, S., Ichikawa, M. and Tajima, K. 2009. Antimicrobial Susceptibility of Respiratory Bacterial Pathogen Isolated from Cattle for the Past 16 Years in Tochigi Prefecture. Japan Veterinary Medical Association 62:533-537.
13. Lillie, L. E. and Thomson, R. G. 1972. The pulmonary clearance of bacteria by calves and mice. Can. J. Comp. Med. 36:129-137.

14. Morioka, A., Asai, T. and Takahashi, T. 2006. Antimicrobial Susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates during 1999 and 2000 in Japan. Japan Veterinary Medical Association 59:815-819.
15. Purdy, C. W., Raleigh, R. H., J. Collins, K., Watts, J. L. and Straus, D. C. 1997. Serotyping and enzyme characterization of *Pasteurella haemolytica* and *Pasteurella multocida* isolates recovered from pneumonic lungs of stressed feeder calves. Curr. Microbiol. 34:244-249.
16. Takahashi, T., Asai, T., Kojima, A., Harada, K., Ishihara, K., Morioka, A., Kijima, M. and Tamura, Y. 2006. [Present situation of national surveillance of antimicrobial resistance in bacteria isolated from farm animals in Japan and correspondence to the issue]. Kansenshogaku Zasshi 80:185-95.
17. Tamura, Y. 2006. 動物用抗菌剤の使用状況と薬剤耐性. 臨床獣医 24:47-52.

Antimicrobial susceptibility of *Mannheimia haemolytica* isolated from cattle with bovine pneumonia

Ken Katsuda.

Tohoku Research Station, Environmental/Enzootic Diseases Research Team,
National Institute of Animal Health, NARO
(31 Uminai, Shichinohe, Kamikita, Aomori, 039-2586, Japan.)