

総説

2010～2018年に北海道十勝管内で分離された 牛由来病原細菌の薬剤耐性調査

宮根和弘

北海道釧路家畜保健衛生所

〒084-0917 釧路市大楽毛127番地の1

TEL：0154-57-8775

FAX：0154-57-6125

E-mail：miyane.kazuhiro@pref.hokkaido.lg.jp

【要約】

薬剤耐性菌の出現・拡散が人医療、獣医療において国際的な問題となっており、耐性菌の出現動向の把握は重要である。そこで、2010～2018年に北海道十勝管内で分離された牛由来主要病原細菌である *Mannheimia haemolytica* (Mh)、*Pasteurella multocida* (Pm)、*Escherichia coli* (Ec) 及び *Mycoplasma bovis* (Mb) の薬剤耐性調査を実施した。薬剤使用状況は、十勝農業共済組合の診療データ及び病性鑑定調書から調査した。Mh及びPmは、乳肉用牛ともにペニシリン(PCG)、ストレプトマイシン(SM)で、肉用牛ではカナマイシン(KM)においても70%以上の耐性率であった。フルオロキノロン(FQ)系の耐性率はMhで乳用牛0～5%、肉用牛22～24%であった。Ecは、PCG系の耐性率は乳用牛100%、肉用牛約70%、FQ系は乳用牛25%、肉用牛約40%であった。コリスチンの耐性率は乳用牛0%、肉用牛36%であった。Mbのタイロシン(TS)及びオキシテトラサイクリン(OTC)はMIC値が高く、FQ系は20.6%が耐性であった。薬剤使用状況は、乳用牛では特にPCG系が多く、乳肉用牛ともにアミノグリコシド系の使用割合が減少し、キノロン系が増加した。多くの抗菌剤で乳用牛と比較し肉用牛由来の細菌の耐性率が高かった。乳肉用牛ともに、MhやPmではPCG及びアミノグリコシド系、MbではTS及びOTCで感受性の低下が認められた。乳肉用牛ともに、Mh、Ec、MbでFQ系の耐性株が散見された。近年、キノロン系の使用割合が増えているため、耐性率の推移は注視していく必要がある。本調査結果は、臨床獣医師をはじめ畜産関係者に広く周知し、適正な薬剤の使用指針として用いていきたい。

キーワード：薬剤耐性、牛呼吸器病、牛下痢症

【はじめに】

近年、薬剤耐性菌の出現、拡散が国際的な問題となっている。家畜由来薬剤耐性菌は、獣医療における抗菌剤の治療効果の低下を招くだけでなく、畜産物を介して人に伝播し、人医療へ悪影響を及ぼすことも懸念されている [15]。

日本でも有数の畜産地帯である北海道十勝管内における牛由来薬剤耐性菌の動向把握は重要である。そこで、2010～2018年までに十勝管内で分離された主要病原細菌の薬剤耐性率や抗菌剤使用状況について調査を実施したので、その結果について概説する。

【調査内容】

供試菌株は、2010年4月～2018年6月まで

受理：2021年9月30日

に当所に依頼された牛の病性鑑定材料から分離された *Mannheimia haemolytica* (Mh) 61 株、*Pasteurella multocida* (Pm) 61 株、*Escherichia coli* (Ec) 70 株、*Mycoplasma bovis* (Mb) 34 株を供試した。Mh の血清型別試験については、免疫家兔血清を用いたスライド凝集法により実施した [4]。

薬剤感受性試験に用いた供試薬剤は、Mh 及び Pm については、ペニシリン (PCG)、アンピシリン (ABPC)、アモキシシリン (AMPC)、セファゾリン (CEZ)、セフトロフル (CTF)、ストレプトマイシン (SM)、カナマイシン (KM)、エリスロマイシン (EM)、オキシテトラサイクリン (OTC)、ナリジクス酸 (NA)、エンロフロキサシン (ERFX)、マルボフロキサシン (MAR)、フロルフエニコール (FFC)、ホスホマイシン (FOM)、ST 合剤 (ST) の 9 系統 15 薬剤を用いて実施した。Ec については、ABPC、AMPC、CEZ、CTF、SM、KM、ゲンタマイシン (GM)、OTC、NA、ERFX、MAR、FFC、FOM、ST、コリスチン (CL) の 9 系統 15 薬剤を用いた。Mb については、スペクチノマイシン (SPM)、アジスロマイシン (AZM)、タイロシン (TS)、OTC、ERFX、FFC、リンコマイシン (LCM)、チアムリン (TML) の 7 系統 8 薬剤を用いて実施した。

薬剤感受性試験方法は、Mh、Pm、Ec では PCG、ABPC、AMPC、CEZ、CTF、SM、KM、GM、OTC、NA、ERFX、FFC、FOM、ST はセンシディスク (日本ベクトンディッキンソン (株))、ERFX、CTF は VKB ディスク (栄研化学 (株))、MAR は薬剤感受性試験ディスク (Meiji Seika ファルマ (株)) を用いたディスク拡散法により実施した。CL は E-test (ビオメリュージャパン (株)) を用いて、最小発育阻止濃度 (MIC) 測定を実施した。判定は、CL は European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing の基準に準じ、その他薬剤については Clinical and Laboratory Standards Institute の基準に準じた。Mh 及び Pm の PCG、ABPC、ST については、感受性以外のものを耐性と判定した。なお、各試験については、Ec ATCC25922 を用いて精度管理範囲内であることを確認した。

Mb では、Hannan ら [12] の報告をもとに、平板希釈法による MIC の測定を実施した。ERFX のみブレイクポイント (BP) は、MIC 分布が二峰性を示した時の中間値とした。なお、試験については、Mb ATCC25523 を用いて精度管理範囲内であることを確認した。

薬剤耐性遺伝子検査は、Pm、Mh については、Cassidy ら [1] の報告を参考に PCR 法により、SM 耐性遺伝子 (*StrA*、*StrB*)、KM 耐性遺伝子 (*aphA1*) の検出を行った。Ec については、Robelo ら [13] の報告を参考にマルチプレックス PCR 法により CL 耐性遺伝子 *mcr-1*、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4*、*mcr-5* の検出を行った。

薬剤使用状況調査は、北海道十勝農業共済組合 (十勝 NOSAI) の 2010～2017 年における診療データ及び、当所の 2010 年～2018 年 6 月における病性鑑定調書から調査した。

【調査結果】

Mh では調査の結果、供試した株の血清型別は、1 型菌が 24 株、6 型菌が 32 株、2 型菌が 5 株であった。Mh の薬剤耐性率は、乳、肉用牛の PCG、SM、肉用牛の ABPC、KM、OTC、NA、ST で 50% 以上の耐性率であった (表 1)。CEZ、CTF、FFC は乳、肉用牛ともに 10% 未満で、ERFX、MAR は肉用牛で約 20% の耐性率であった。フルオロキノロン (FQ) 系薬剤の耐性株は 2010～2012 年にかけて 11 株検出され、9 株が肉用牛由来の 6 型菌であり、肉用牛由来 1 型菌、乳用牛由来 2 型菌が各々 1 株存在した。各血清型別で 3 系統以上の薬剤で耐性を示した割合は、1 型の乳用牛で 10%、1 型の肉用牛で 21%、6 型の乳用牛で 0%、6 型の肉用牛で 79% であった。

Pm の各薬剤の耐性率は、乳、肉用牛の SM、肉用牛の KM、NA で 50% 以上であった (表 1)。CTF、ERFX、MAR の耐性株は存在しなかった。

Ec について、下痢症 (44 株) と、流産や敗血症といった下痢症以外の疾病 (その他) (26 株) から分離された株の耐性率を比較したところ、全薬剤について下痢症由来の耐性率の方が高かった (表 1)。下痢症由来の Ec について、乳、肉用牛の耐性率を比較したところ、ABPC、AMPC、KM、OTC では乳用牛の方が高かった。

表1 供試細菌の薬剤耐性率又はMIC

系統	薬剤名	略称	供試細菌の薬剤耐性率又はMIC (μg/ml)				
			Mh(乳/肉)	Pm(乳/肉)	Ec(下痢症/その他)	下痢症由来Ec(乳/肉)	Mb(MIC50/MIC90)
ペニシリン系	ペニシリン	PCG	75%/76%	0%/10%	NT	NT	NT
	アンピシリン	ABPC	30%/54%	5%/12%	80%/23%	100%/72%	NT
	アモキシシリン	AMPC	5%/27%	11%/0%	79%/24%	100%/71%	NT
セフェム系	セファゾリン	CEZ	0%/5%	5%/0%	27%/4%	25%/28%	NT
	セフトオフル	CTF	0%/0%	0%/0%	25%/0%	17%/28%	NT
アミノグリコシド系	ストレプトマイシン	SM	95%/98%	74%/88%	91%/29%	92%/91%	NT
	カナマイシン	KM	25%/76%	47%/83%	75%/8%	92%/69%	NT
	ゲンタマイシン	GM	NT	NT	45%/4%	50%/44%	NT
	スペクチノマイシン	SPM	NT	NT	NT	NT	1/2
マクロライド系	エリスロマイシン	EM	0%/7%	11%/2%	NT	NT	NT
	アジスロマイシン	AZM	NT	NT	NT	NT	0.5/2
	タイロシチン	TS	NT	NT	NT	NT	64/128
リンコマイシン系	リンコマイシン	LCM	NT	NT	NT	NT	1/2
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	OTC	0%/59%	21%/45%	91%/19%	100%/88%	64/64
キノロン系	ナリジクス酸	NA	15%/59%	17%/69%	52%/17%	33%/58%	NT
	エンロフロキサシン	ERFX	0%/22%	0%/0%	34%/15%	25%/38%	0.5/32
	マルボフロキサシン	MAR	5%/24%	0%/0%	35%/19%	25%/39%	NT
チアンフェニコール系	フロロフェニコール	FFC	5%/2%	5%/5%	69%/16%	55%/74%	8/32
ポリペプチド系	コリスチン	CL	NT	NT	5%/5%	0%/36%	NT
	ホスホマイシン	FOM	0%/2%	0%/7%	20%/0%	8%/25%	NT
その他	ST合剤	ST	40%/54%	21%/40%	75%/19%	67%/78%	NT
	チアムリン	TML	NT	NT	NT	NT	0.5/4

表2 Mh、Pmのアミノグリコシド系耐性遺伝子保有率

	SM		KM
	<i>strA</i>	<i>strB</i>	<i>aphA1</i>
Mh(n=61)	36%	39%	34%
Mh6型(n=32)	63%	69%	59%
Mh1型(n=24)	4%	4%	4%
Mh2型(n=5)	20%	20%	20%
Pm(n=61)	31%	28%	30%

CLの耐性率は乳用牛では8%、肉用牛では34%であった。CTFの乳、肉用牛の耐性率は、各々17%、28%で、FQ系薬剤の乳、肉用牛の耐性率は各々25%、38～39%であった。

Mbについては、鼻汁、肺、耳垢由来23株、乳汁由来11株についてMICの測定を実施し、TSやOTCのMICは高値に分布し、AZMやSPMについては低値に分布した(表1)。LCM、FFC、TMLは9割の株のMICは低値に分布したが、肉用牛由来1株の値が高かった。ERFXについては2峰性の分布を示し、ブレイクポイントを4μg/mLと設定した場合、耐性率は20.6%(乳用牛2株、肉用牛5株)であった。耐性株は全て呼吸器関連の検体由来で、2011年に1株検出され、2013年以降はほぼ毎年1～2株検出された。乳汁由来のMbについては、ERFX耐性株は検出されなかった。

薬剤耐性遺伝子の検査成績は、アミノグリコシド系薬剤耐性遺伝子である、*StrA*、*StrB*、

*aphA1*の陽性率はMhの6型菌が約60%、1型菌が4%、2型菌が20%であった(表2)。Pmの陽性率は約30%であった。また、これら耐性遺伝子を保有しているのはMhでは全て、Pmについては約9割が肉用牛由来株であった。

CLのMICが2.0mg/L以上のEc12株について、CL耐性遺伝子の有無をマルチプレックスPCR法で検索した結果、*mcr-1*陽性が6株、*mcr-5*陽性が4株、*mcr-1*及び*mcr-5*陽性が1株、*mcr-3*陽性が1株であった。

抗菌剤使用状況調査の結果、2010～2017年において、十勝NOSAIで肺炎、腸炎、乳房炎、手術、その他疾病原因(全体)で使用された各系統の薬剤の推移を、図1に示した。乳用牛では、ペニシリン系の使用割合が多かった。乳、肉用牛ともに近年では、アミノグリコシド系薬剤が減少した一方で、キノロン系の使用割合が増加した。サルモネラ症対策等の場合を除いて、十勝NOSAIでは通常の診療で第一選択薬として、FQ系が使用されることはなかった。肺炎治療では、乳、肉用牛ともにチアンフェニコール系の割合が最も高かった。肺炎や腸炎の治療においても、乳、肉用牛ともに、アミノグリコシド系の減少、キノロン系の増加が見られた。使用割合は多くないが、セフェム系に関しては生乳出荷制限がかからないCTF製剤が乳用牛の肺炎治療で使用されている事例が2017年以降、確認された。

十勝NOSAI以外の診療施設における抗菌薬

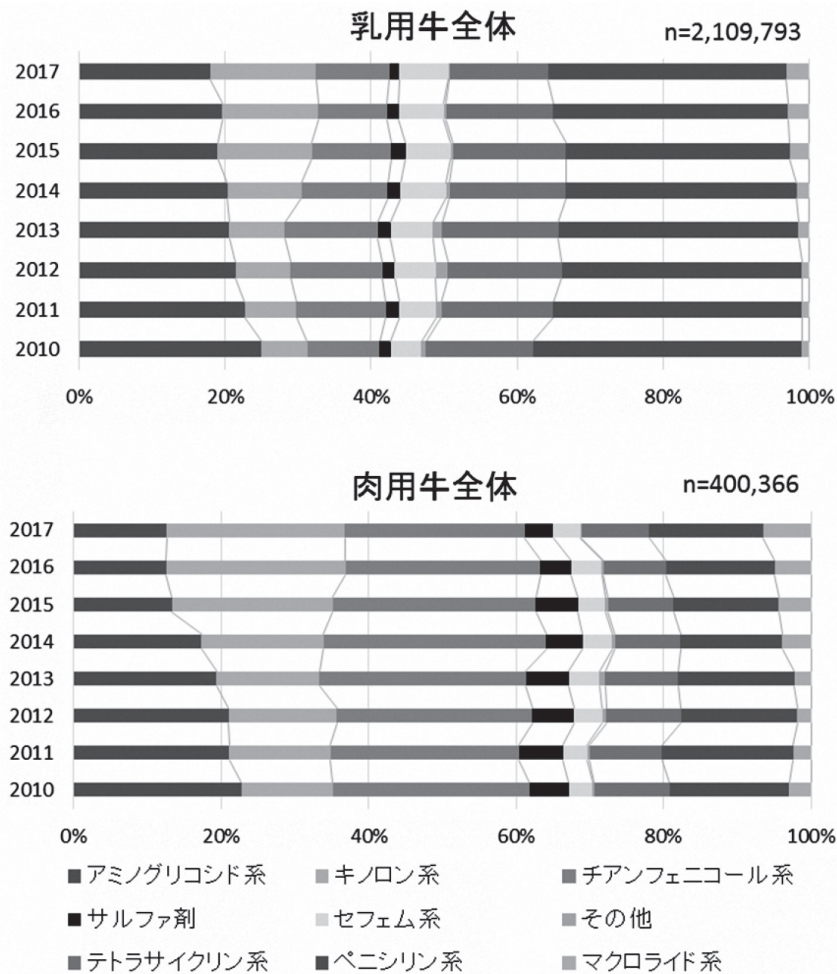


図1 十勝NOSAIにおける抗菌剤使用割合の推移

の使用状況について、病性鑑定調書をもとに調査した結果、大規模肉用農場において肺炎や腸炎の治療のため、第一次選択薬としてFQ系が使用された事例や、導入直後に肺炎予防のためにワクチンとともに抗菌剤が使用された事例が散見された。また、肺炎治療のため、FQ系薬剤、CTF、FFCによる長期間の治療歴があるものも認められた。ロボット哺乳群で疾病予防のため、CLをミルクに添加して使用された事例が認められた。

【考察】

乳、肉用牛ともにMhやPmではPCG、アミノグリコシド系の耐性率が高かったが、これは、PCG及びSMの複合薬剤は適応範囲が広く、第一選択薬として多用されているためと推察された。一方、FFCの耐性率はMh、Pmともに10%未満であった。肺炎治療で使用割合が高い薬剤ではあるが、使用目的が呼吸器病に限局

的であることが一因と推察された。FQ系については、Pmでは耐性株は存在しなかったが、Mhでは乳用牛で5%以下、肉用牛で約20%の耐性率であった。これら耐性株は2010～2012年に分離されており、2013年以降はMhのFQ耐性株は確認されなかった。近年、キノロン系の使用割合は増えているにもかかわらず、MhのFQ系薬剤の耐性化が進んでいない要因は不明であるが、今後も耐性率の推移をモニタリングしていく必要がある。Mh6型菌の多剤耐性傾向については、高木らが十勝管内の肉用牛由来の6型菌は多剤耐性であったと報告した[14]。今回のMh1型菌、6型菌についても、3系統以上の薬剤で耐性を示した割合を調査したところ、1型の乳、肉用牛は10～21%であり、6型の肉用牛では79%が多剤耐性であったが、同じ6型菌であっても乳用牛では多剤耐性株は存在しなかった。本調査や既報[8]においても、大規模肉用農場では、導入直後から様々な抗菌

剤が使用されていることがわかった。血清型による薬剤耐性状況の違いは、薬剤使用状況が影響しているものと推察された。Mh、Pmのアミノグリコシド系の耐性率が他の系統に比べて高かったため、SM、KMの耐性遺伝子の有無を調べたところ、Mh、Pmともに耐性遺伝子の検出率が肉用牛でより高く、多剤耐性傾向が強い肉用牛由来のMh6型菌において検出率が最も高かった。耐性遺伝子を疫学マーカーとして用いることで、乳用牛と肉用牛とは、異なる株が蔓延していると考えられた。

Ecの耐性率については、下痢症とその他の株と比較したところ、下痢症由来のEcの方が、供試した全薬剤の耐性率が高いことが判明した。Ecについては、下痢症とその他の検体由来株とは薬剤耐性状況が大きく異なることが判明したため、下痢症由来のEcについて、乳、肉用牛の耐性率を比較した。ABPC、AMPC、KM、OTCでは、肉用牛に比べて乳用牛の耐性率が高く、特にABPC、AMPC、OTCでは100%の耐性率であった。ペニシリン系薬剤の使用割合は、乳用牛では第四胃変位手術等で使用される頻度が高く、OTCは一般的に乳房炎の治療の際に使用されることが一因と推察された。人医療においても重要な薬剤である、第3世代セファロスポリン系薬剤であるCTFやFQ系薬剤の耐性率は、肉用牛で高く、各々約20%、38%であった。通常の診療で第一選択薬としてFQ系薬剤を使用することはないものの、十勝NOSAIでのキノロン系の使用割合は近年増加している。CTFに関しては、2017年より新たに販売されたCTF製剤が大規模肉用農場や、乳用牛の肺炎治療で使用された事例がみられた。これら抗菌剤の使用割合は今後も増えていくことが考えられるため、耐性率の推移については注視が必要と思われる。CLの耐性率は乳用牛に比べて、肉用牛でより高かった。大規模肉用農場1戸においてCLの使用歴が認められたが、CLは牛の臨床では一般的に使用される抗菌剤ではないため、治療による選択圧がかかりやすい薬剤ではないと思われる。そこで、耐性要因推察のため、伝達性プラスミド上の耐性遺伝子*mcr-1*、*mcr-2*、*mcr-3*、*mcr-4*、*mcr-5*遺伝子 [2, 9, 10, 16, 17] の有無について調べたところ、11株は*mcr-1*、*mcr-5*のいずれ

か又は両方を、1株は*mcr-3*を保有しており、CL耐性に関与していると考えられた。伝達性プラスミド上のコリスチン耐性遺伝子は、菌種を越えて伝播する懸念が指摘されていることから [6]、コリスチンの適正使用については、今後も啓発が必要と考える。

Mbについては、TSやOTCについては、既報 [5] と同様に、本調査の供試株においても感受性の低下が確認された。国内では、牛の治療で使用されることがないAZMやSPMについては、全株のMIC値が低値であったため、耐性化はしていないと思われる。LCMやFFC、TMLについては、肉用牛由来の1株で感受性の低下が示唆された。ERFXの耐性率は20.6%であり、他県での報告 [3, 7] よりも高い値であった。今回の調査期間では、乳汁由来MbではERFX耐性株は存在しなかったが、2011年以降ほぼ毎年、呼吸器疾病関連の検体から耐性株が1~2株検出されている。ERFXはMb感染症の最終選択薬の一つであり、今後も本菌のERFX耐性の動向に注意を払う必要がある。

今回供試した細菌の薬剤耐性率は、検査方法が異なるものの、多くの薬剤で国内の動物由来薬剤耐性菌モニタリングにおける調査結果 [11] よりも高かった。今後も管内の薬剤耐性率や抗菌剤使用状況の調査を継続し、臨床獣医師はじめ、畜産関係者へ広く情報提供し、適正な薬剤の使用指針として用いていきたいと考える。

【謝辞】

稿を終えるにあたり、本発表にご尽力いただいた、十勝農業共済組合 林口治先生、動物衛生研究部門 勝田賢先生、秦英司先生に深謝いたします。

【引用文献】

- [1] Cassidy LK, Rahat Z, Shaun RC, et al : Pathogens of Bovine Respiratory Disease in North American Feedlots Conferring Multidrug Resistance via Integrative Conjugative Elements, Journal of Clinical Microbiology, 52, 438-448 (2014)
- [2] Carattli A, Villa L, Feudii C et al : Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in Salmonella and Escherichia coli, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016, Euro Surveill, 22 (2017)

- [3] 加藤敏英、山本高根、小形芳美 他：薬剤感受性に基づいた牛呼吸器感染症治療プログラムの臨床効果、日獣会誌、61、294-298 (2008)
- [4] Katsuda K, Kamiyama M, Kohomoto M, et al : Serotyping of *Mannheimia haemolytica* isolates from bovine pneumonia: 1987–2006, *The Veterinar Journal*, 178, 146-148 (2008)
- [5] Kawai K, Higuchi H, Iwano H, et al : Antimicrobial susceptibilities of *Mycoplasma* isolated from bovine mastitis in *Japan Animal Science Journal*, 85, 96-99 (2014)
- [6] 川西路子：動物用抗菌性物質を取り巻く現状 (15) 動物用抗菌剤の各論 (その4) ペプチド系抗生物質、日獣会誌、70、707-710 (2017)
- [7] 小池新平、宇佐美佳秀： *Mycoplasma bovis* の薬剤感受性とマクロライド耐性株の23S リボソーム RNA ドメイン V 領域の解析、日獣会誌、64、45-49 (2011)
- [8] 小池新平、井上恭一、米山州二 他：栃木県で過去16年間に分離された牛呼吸器病原菌の薬剤感受性調査、日獣会誌、62、533-537 (2009)
- [9] Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al : Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study , *Lancet Infect Dis*, 16, 161-168 (2016)
- [10] Maria B, Jennie F, Jens AH, et al : Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in *d*-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B, *J Antimicrob Chemoth*, 72, 3317-3324 (2017)
- [11] 農林水産省動物医薬品検査所：動物医薬品検査所 HP、(http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai_p3-3.html)
- [12] Peter C.T. Hnanan: Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species, *Vet Res*, 31, 373-395 (2000)
- [13] Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, et al: Multiple PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes, *Eurosurveillance* 23, 29-39 (2018)
- [14] 高木裕子、大野治、中岡祐司 他：北海道十勝管内の牛から分離された *Mannheimia haemolytica* の血清型別、薬剤感受性試験、パルスフィールドゲル電気泳動を用いた疫学的検討、日獣会誌、64、215-220 (2011)
- [15] 田村豊：動物用抗菌剤の使用動向と薬剤耐性菌対策、日獣会誌、56、685-691 (2003)
- [16] Xavier BB, Lammens C, Ruhel R, et al : Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016, *Euro Surveill*, 21 (2016)
- [17] Yin W, Li H, Shen Y et al : Novel Plasmid-Mediated Colistin Resistance Gene *mcr-3* in *Escherichia coli*, *mBio*, 8, 3 (2017)

Antibiotic resistance investigation of bacterial pathogens isolated from cattle in Tokachi area, Hokkaido from 2010 to 2018

Kazuhiro Miyane

Hokkaido Kushiro Livestock Hygiene Service Center
084-0917 127-1, Otanoshike, Kushiro, Japan
TEL; 0154-57-8775
FAX; 0154-57-6125
E-mail: miyane.kazuhiro@pref.hokkaido.lg.jp

[Abstract]

Antibiotic resistance is one of the biggest threats to global public health and livestock animal hygiene. The establishment of corresponding management options relies on scientifically defensible efforts to obtain objective data on the prevalence of bacterial resistance in livestock. In this report, we investigated the resistance rates of four bacterial pathogens isolated from cattle in Tokachi area, Hokkaido from 2010 to 2018. Over 70% of *Mannheimia haemolytica* (Mh) and *Pasteurella multocida* (Pm) show resistance to penicillin and streptomycin. The resistance rates to kanamycin and fluoroquinolone differed by origin, beef cattle isolates show 76 and 22-24%, on the other hand, dairy cattle isolates show 25 and 0-5%, respectively. The resistance rate of *Escherichia coli* (Ec) to penicillin was 70% (beef cattle) and 100% (dairy cattle), to fluoroquinolone was 40% and 25%, to colistin was 36% and 0%, respectively. *Mycoplasma bovis* (Mb) showed high minimal inhibitory concentration (MIC) to tylosin and oxytetracycline, and resistance rate to fluoroquinolone was 20.6%. Though quinolone antibacterials are not first choice agents in NOSAI veterinarians, usage is increasing in a decade. Resistance rates should be under scrutiny and evidence based guideline for appropriate antibacterial using is required.

Keywords: Antibiotic resistance, bovine respiratory disease, bovine diarrhea

