

子牛の *Mannheimia haemolytica* による壊死性化膿性気管支肺炎

県央家畜保健衛生所

山本 英子 後藤 裕克
荒木 尚登 和泉屋 公一

はじめに

Mannheimia haemolytica (以下Mh) は、牛パストツレラ (マンヘミア) 症の原因菌の一つで、主に子牛に呼吸器病を引き起こす^{1) 2)}。健康牛の上部気道粘膜からしばしば検出され、飼養環境や気候の急変、長距離輸送、他の微生物の感染などのストレス感作により発生することが多い³⁾。

今回生後 2 日齢の子牛にMh を原因とする肺炎の発生があったのでその概要を報告する。

発生の概要

県内の乳用牛 50 頭、肉用牛 29 頭を飼養する乳肉複合経営農場で、平成 29 年 1 月 18 日に娩出された子牛が 2 日後に死亡した。当該子牛の母牛は平成 28 年 12 月 22～24 日に発熱及び下痢を呈していたため治療を実施した。1 月 24 日に分娩予定であったが、分娩房の関係で、1 月 16 日に分娩誘起を開始した。当該子牛は 1 月 18 日に産道より後肢が出ていたが、活力がなかったため、牽引・蘇生が行われた。子牛は出生後、自力では起立できず、翌日の 19 日には股開きをおこし、2 日後の 20 日には低体温、発咳を呈し死亡した。子牛の凍結初乳の哺乳量は、出生当日は約 1.2kg、翌日は 2.2kg であった。

材料と検査方法

1 材料

2 日齢の死亡子牛で、品種は黒毛和種、性別は雌、受精卵移植産子であった。

2 検査方法

(1) 細菌学的検査

肺、肝臓、脾臓、腎臓、脳について、 β -NAD加血液寒天培地、DHL寒天培地を用い、37°C24時間、好気および微好気培養を実施した。

(2) ウイルス学的検査

肺、肝臓、脾臓、腎臓、脳、肺門リンパ節について、MDBK-SY細胞を用いたウイルス分離を実施した。また、PCR法により、肺、肺門リンパ節について、牛パラインフルエンザウイルス3型（以下PI3）遺伝子検索、牛RSウイルス遺伝子検索、牛コロナウイルス遺伝子検索及びペスチウイルス遺伝子検索を、血清についてペスチウイルス遺伝子検索を実施した。

(3) 病理組織学的検査

肺、心臓、肝臓、脾臓、腎臓、脳、脊髄、胃、腸管、膵臓、胸腺、副腎、肺門リンパ節、腸間膜リンパ節、兎径リンパ節について、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、定法に従いパラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色（以下HE染色）を実施した。さらに、肺についてグラム染色、PTAH染色、第四胃についてグラム染色を実施した。

(4) 免疫組織化学的検査

肺のパラフィン切片を用い、免疫組織化学的染色（以下IHC）を実施した。一次抗体は抗Mh家兎血清（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門より分与）を用い、市販キット（ヒストファイン SAB-PO（R）キット、株ニチレイ）の手順に従って実施した。

結 果

1 外貌・剖検所見

体重は24.5kgで、出生時の体重25.4kgよりやや減少していた（写真1）。肺では、前葉・中葉・副葉を中心に赤色硬結病変が見られた（写真2）。肺に割を入れると、後葉でも広範囲に病変が確認された。胸腺は低形成であった（写真3）。第四胃では粘膜に大豆大の暗赤色斑が見られた。その他主要臓器では著変が見られなかった。



写真1 死亡子牛の外貌

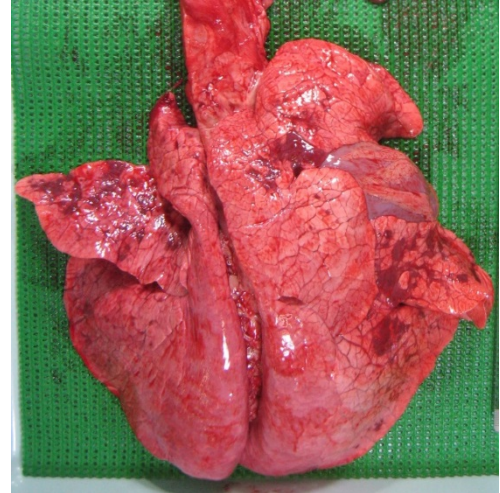


写真2 赤色硬結病変



写真3 胸腺の低形成

2 細菌学的検査

肺より、Mhと *Streptococcus dysgalactiae* (以下S d) を分離した。分離したMhについて血清型別を実施したところ、血清型1であった。(国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門に依頼)

3 ウイルス学的検査

各臓器からウイルスは分離されなかった。また、P I 3 遺伝子、牛R S ウイルス遺伝子、牛コロナウイルス遺伝子、ペスチウイルス遺伝子は検出されなかった。

4 病理組織学的検査

肺では、肺胞腔内に漿液が貯留し、細気管支周囲を中心に好中球の浸潤が認められた(写真4、5)。浸潤した好中球の中には、核が伸張した燕麦様細胞が認められた(写真6)。細気管支では

上皮細胞の壊死が見られ、細気管支腔内には好中球が認められた（写真7）。小葉間結合組織は水腫性に肥厚していた（写真8）。PTAH染色を実施したところ、線維素の析出は認められなかった。肺胞壁の毛細血管や小血管で血栓形成が認められた（写真9）。肺についてグラム染色を実施したところ、病変部で多数のグラム陰性菌が認められ、一部グラム陽性菌が確認された（写真10）。第四胃では粘膜の出血及び壊死が認められ、グラム染色を実施したところ、病変部にグラム陰性菌が多数認められた。その他の臓器では著変は認められなかった。

5 免疫組織化学的検査

肺の病変部で多数の陽性抗原が認められ、細気管支上皮細胞においても陽性抗原が認められた（写真11、12）。

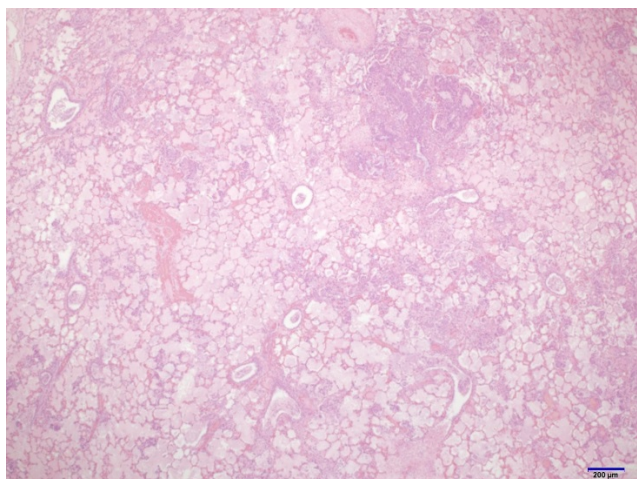


写真4 漿液の貯留

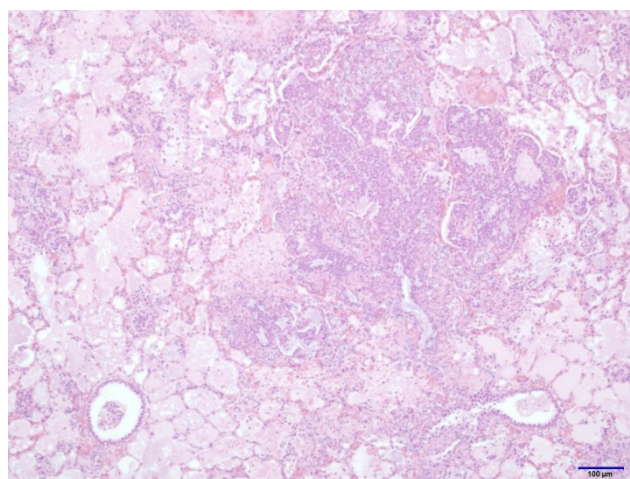


写真5 細気管支周囲の好中球浸潤

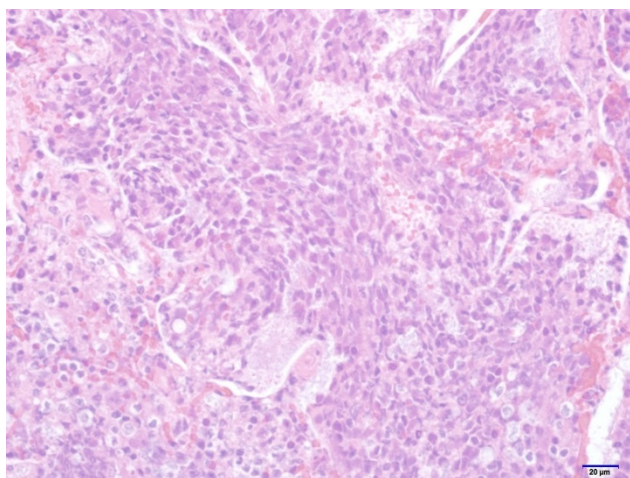


写真6 燕麦様細胞

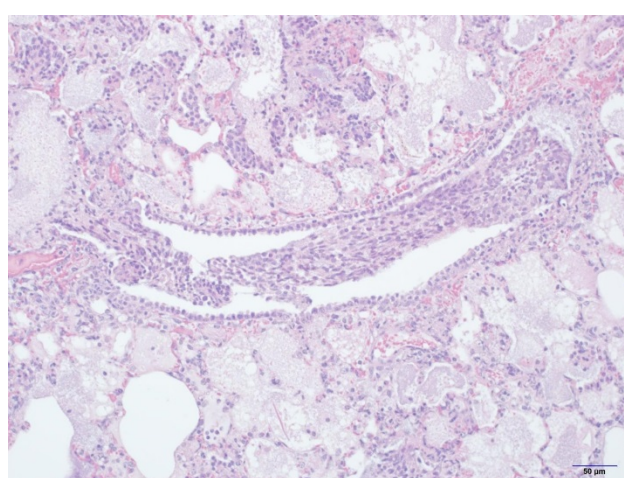


写真7 細気管支上皮細胞の壊死

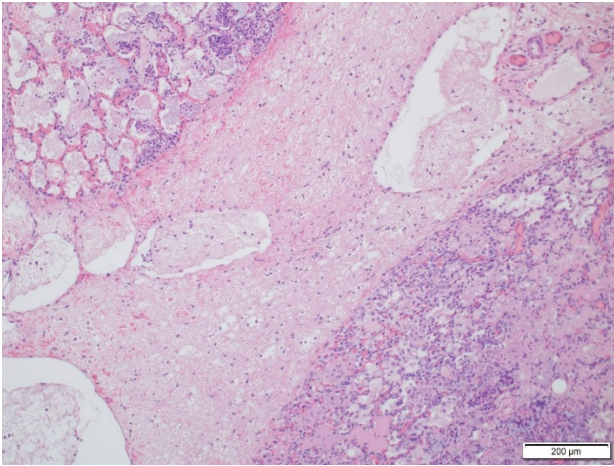


写真 8 小葉間結合組織の水腫性肥厚

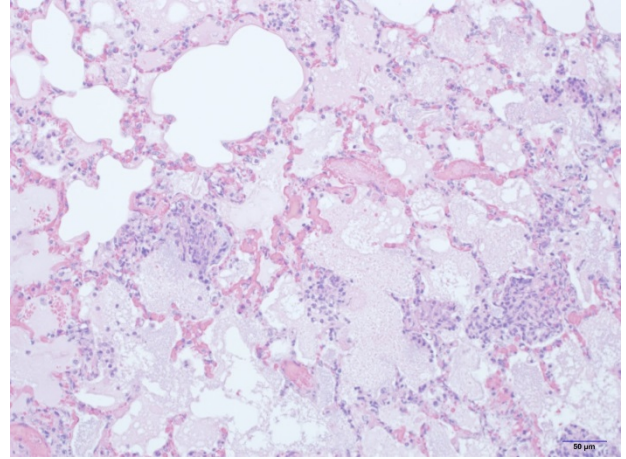


写真 9 血栓形成

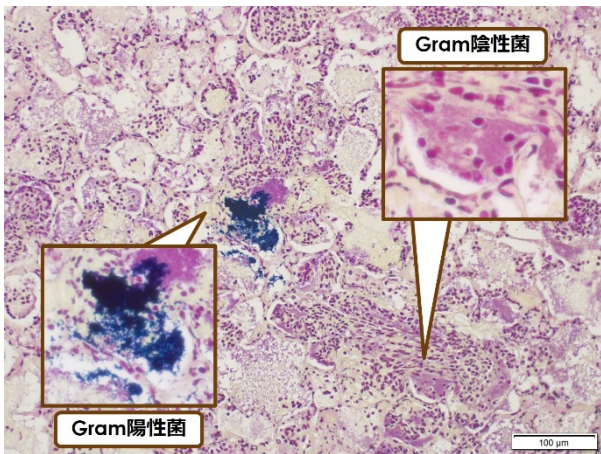


写真 10 肺病変部のグラム染色

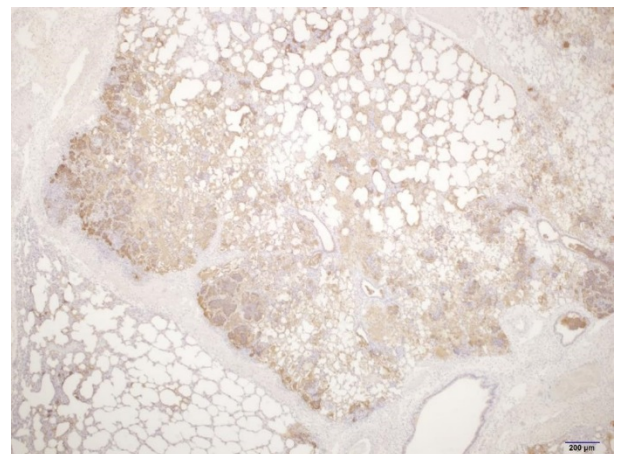


写真 11 肺病変部の陽性抗原 (IHC)

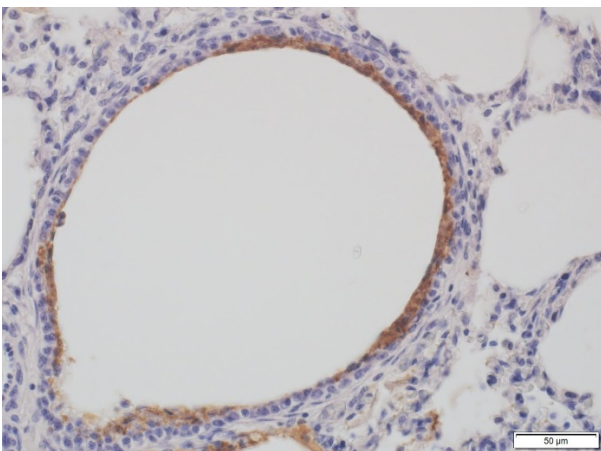


写真 12 細気管支上皮細胞の陽性抗原 (IHC)

まとめ及び考察

乳肉複合農場において、2日齢の黒毛和種の子牛が死亡したため、病性鑑定を実施したところ、細菌検査でMhが分離され、病理組織学的検査及び免疫組織化学的検査の結果から、Mhによる壊死性化膿性気管支肺炎と診断した。細菌検査で分離されたSdについては、肺のグラム染色の結果から、肺の病変には関与していないものと考えられた。

肺の病理組織所見において、細気管支周囲を主体とした好中球の浸潤が見られたことから、Mhが経気道的に感染したと考えられ、肺胞腔内の漿液の貯留や、小葉間結合組織の水腫性肥厚が見られたことなどから、牛パスツレラ（マンヘミア）症で見られる線維素性肺炎の急性期の病変であると考えられた⁴⁾。また羊水の誤嚥などの生前の感染を疑う所見が認められなかったことから、当該子牛はMhに生後感染したと考えられた。

今回、子牛は出生時活力がなく、出生後も自力では起立できず、哺乳力が弱かったことから、虚弱傾向にあったと考えられた。さらに、胸腺の低形成が見られたことから、免疫機能が低下していたと考えられた。一般的に、虚弱子牛の産出は、先天性の免疫不全や、ホルモン分泌異常、ストレスや、妊娠期の栄養障害など母子双方に要因があると考えられている。今回の虚弱傾向や胸腺の低形成の原因は不明だが、子牛が虚弱傾向にある中で、妊娠末期に母牛の健康状態が悪化したこと、分娩予定日より約1週間早く分娩したことなども、子牛の状態に影響を与えた可能性も考えられた。このように、虚弱傾向で免疫機能が低下している状態で、出生後Mhに感染し、肺炎が急速に進行し、死亡したと考えられた。

稿を終えるにあたり、Mhの血清型別検査を実施していただきました国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域 病原機能解析ユニット 勝田賢先生に深謝致します。

引用文献

- 1) 病性鑑定指針 平成27年3月13日付消安第4686号農林水産省消費安全局通知, 137 - 138
- 2) 日本獣医病理学会：動物病理学各論（第2版）、111 - 112
- 3) 清水高正、稲葉右二、小沼 操、金川弘司、藤永 徹、本好茂一：牛病学 第2版 320 - 321
- 4) 日本獣医病理学会：動物病理学各論（第2版）、103 - 104

県内1農場で発生した牛ボツリヌス症

県央家畜保健衛生所

池田 知美 後藤 裕克
荒木 尚登 和泉屋 公一

緒 言

牛ボツリヌス症は、グラム陽性偏性嫌気性桿菌であるボツリヌス菌 *Clostridium botulinum* が産生する神経毒素（以下、B o NT）による疾病である。牛が *C. botulinum* もしくはB o NTそのものを経口摂取すると、小腸などから吸収されたB o NTが血行性に末梢神経に達し、神経伝達物質アセチルコリンの放出を阻害するため、筋肉の収縮は阻害され、弛緩性の麻痺を引き起こす。このため、後躯麻痺、起立不能などが認められ、呼吸筋の麻痺による呼吸困難に陥り死亡する¹⁾。

B o NTは、抗原性の違いによりAからGの7種の血清型に区別される。牛はCおよびD型毒素に感受性があり、これらの毒素を産生する菌の中には、「モザイク型毒素」を産生する株が存在する（図1）。たとえばD/Cモザイク型毒素の場合、D型の構造のうち、一部がC型の構造となっている³⁾。B o NTは、検体を型別抗血清と混合してマウスに接種し、特有症状を示して死亡するか否かを見る「毒素中和法」で血清型別を確認する。D型毒素の場合、D型抗血清で毒素が中和されてマウスは生存するが、「D/Cモザイク型」の場合、C型抗血清でも一部中和されるため、マウスが死亡するまでの時間が延長したり、生存することがある。

県内1肥育牛農場で、平成28年7月及び平成29年1月、起立不能と死亡が発生し、1月の発症牛を牛ボツリヌス症と診断したので、その概要を報告する。

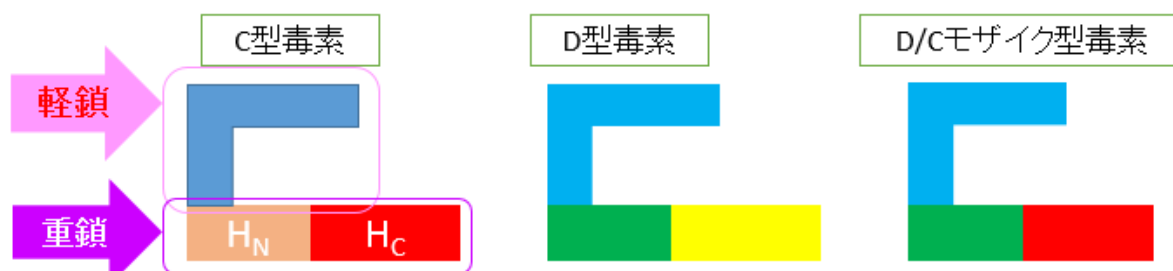


図1 C型・D型毒素の抗原構造

発生概要

発生農場(写真1)は、約40頭を飼養する肥育農場で、配合飼料と乾草を購入して給与していた。夏場は雑草を含む青刈り飼料も給与しており、水は井戸水を給与。素牛の導入は不定期で、牛舎にはカラスの侵入が多く見られた。

平成28年7月中旬以降、起立不能と死亡が続発し、2頭死亡、3頭起立不能になった時点で診療獣医師から検診依頼があり、死亡牛2頭、起立不能牛2頭、野鳥糞便、敷料についてボツリヌス検査を含む病性鑑定を実施した。

その後本農場では牛ボツリヌス症のワクチン接種を継続していたが、平成29年1月にワクチン未接種導入牛で再び急死事例が発生し、起立不能も続発。病性鑑定は死亡牛1頭、起立不能牛1頭の直腸便、野鳥糞便に加え、今回は無症状の同一房同居牛1頭(後に起立不能)の直腸便、6箇所(牛床由来材料)について実施した。



写真1 発生農場

一般病性鑑定 材料と方法

1 供試材料

7月の発生では死亡牛2頭を、1月の発生では死亡牛1頭を供試した。

2 方法

(1)細菌学的検査

死亡牛の主要臓器および第四胃・直腸内容物について、 β -NAD加羊血液寒天培地(37℃、24~48時間、好気および微好気)、DHL寒天培地(37℃、24~48時間、好気)、CW寒天培地(37℃、24時間、嫌気、7月のみ)での分離培養を実施した。

(2)ウイルス学的検査

死亡牛の主要臓器からのウイルス分離を実施した。

(3)病理学的検査

死亡牛の主要臓器を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色して観察した。

(4) 生化学的検査(7月のみ)

死亡牛 2 頭の肝臓、腎臓、胃内容について、シェーレル法(黄リン)、シェーンバイン・パーゲンステッヘル法(青酸)、ラインシュ法(砒素、アンチモン、水銀)にて対象の検出を実施した。

一般病性鑑定 結果

1 細菌学的検査

7月の死亡牛のうち、肺炎症状を示した1頭の肺から *Mannheimia haemolytica* が分離されたが、死亡との関係は不明。その他の検体から有意な菌は分離されなかった。

2 ウイルス学的検査

全ての検体からウイルスは分離されなかった。

3 病理学的検査

7月死亡の2頭に小腸小動脈・細動脈のフィブリノイド変性が共通して認められ、肺炎症状を示した1頭では壊死性化膿性気管支肺炎や線維索性胸膜肺炎像が認められた。また、1月の事例では、第一胃に潰瘍性胃炎、肺の一部に化膿性肺炎が認められたが、どちらの事例も死亡に直接関与するような所見は見られなかった。

4 生化学的検査

全ての検体において、全項目陰性であった。

ボツリヌス検査 材料と方法

検診時の状況から牛ボツリヌス症を疑い、一般細菌の検査に並行して、農研機構動物衛生研究部門の定めるマニュアル²⁾ に準じたボツリヌス検査を実施。本来は、まず検体から直接毒素の検出を試み、その後増菌培養液からの検出を行うが、当所ではマウスの調達に時間がかかることから、直接検出は行わず、加熱処理増菌培養液のみ検査を実施。市販のPCRプライマーセットによる毒素遺伝子検索も実施した。

1 供試材料

(1)7月の発生

死亡牛2頭の第一胃内容物と直腸内容物、敷料（3牛房分を1プール）、野鳥糞便を供試した。

(2)1月の発生

死亡牛1頭の第一胃内容物と直腸内容物、採材時無症状（後に起立不能）の同一房同居牛1頭の直腸便、起立不能牛1頭の直腸便、敷料（6箇所）、野鳥糞便を供試した。

2 方法

(1)7月の発生

検体を強化クックドミート培地で37°C3~7日間嫌気培養し、4倍希釈した培養上清をマウス腹腔内に接種して最長4日間観察。腹壁の振動・陥凹などの特有症状を呈して死亡したものを毒素陽性とした（毒素検査）。また、培養上清について、市販のプライマーセットを用いたPCR法による毒素遺伝子スクリーニング（以下、PCR）も実施した。毒素検査陽性検体については、C型及びD型抗血清と混合し、最終濃度4倍としてマウス腹腔内に接種。マウス生死により毒素型別を行った（毒素中和法）。

(2)1月の発生

検体を強化クックドミート培地で37°Cで4ないし10日間嫌気培養後、7月に使用したのと同じプライマーセットでPCRを実施した。PCR陽性検体については、マウス腹腔内接種による毒素検査を実施後、陽性検体のみ、7月と同様に毒素中和法による毒素型別を実施した。

ボツリヌス検査 結果

1 7月の発生

毒素検査では、死亡牛由来材料や敷料はPCR・マウス接種による毒素検査ともにすべて陰性であり、野鳥の糞便のみ、PCRではD型陽性、マウス接種による毒素検査でも陽性であった。

毒素型別では、D型抗血清と混合した検体を接種したマウスのみ生存した。これにより、野

表1 毒素検査結果(7月)

材料	PCR結果	マウス接種法結果
死亡牛 (胃・直腸内容)	陰性	陰性
起立不能牛 (直腸便)		
発症牛飼養牛房敷料		
野鳥糞便	D型陽性	陽性

鳥糞便検体の中にはD型のB o N Tが存在することが証明された。

表 2 毒素型別(毒素中和法)結果(7月)

材料	試験区分	結果
野鳥糞便	コントロール	死亡
	C型中和	死亡
	D型中和	生存

2 1月の発生

死亡牛の直腸内容と同一房同居牛の直腸便でPCRがD型陽性であり、マウス接種による毒素検査でも陽性であった。敷料は6箇所のうち4箇所がPCRでD型陽性、マウス接種でも陽性であった。起立不能牛直腸便と野鳥糞便はPCRで陰性となった。

毒素型別では、同一房同居牛の直腸便と、敷料のうち2箇所においては、D型抗血清のマウスのみ生存し、これらの検体についてはD型のB o N Tが存在することが証明された。しかし、死亡牛直腸内容と敷料のうち1箇所については、C型・D型どちらの抗血清を接種したマウスも生存し、残りの敷料1箇所については、コントロールとして培養上清のみを接種したマウスも含め、全てのマウスが生存した。これらの結果から、死亡牛直腸内容および敷料の1箇所については、B o N Tは存在するものの血清型は不明、敷料残り1箇所については、判定不能となった。

このため、血清型が特定できなかった検体について、検体からの菌分離とPCRによる毒素遺伝子型別を大阪府立大学に依頼した。このPCRは、前述の市販キットとは違い、モザイク型毒素も

表 3 毒素検査結果(1月)

材料	PCR結果	マウス接種法結果
死亡牛(胃・直腸内容)	D型陽性※	陽性※
同一房同居牛(直腸便)	D型陽性	陽性
発症牛飼養牛房敷料	D型陽性※※	陽性※※
起立不能牛(直腸便)	陰性	NT
野鳥糞便		

※：直腸内容のみ陽性 ※※：採材6箇所中4箇所のみ陽性

表 4 毒素型別(毒素中和法)結果(1月)

材料	試験区分	結果
同一房同居牛(直腸便)敷料(2箇所)	コントロール	死亡
	C型中和	死亡
	D型中和	生存
死亡牛(直腸内容)敷料(1箇所)	コントロール	死亡
	C型中和	生存
	D型中和	生存
敷料(1箇所)	コントロール	生存
	C型中和	生存
	D型中和	生存

型別できるもの⁴⁾で、本来は菌分離をして寒天培地上に発育したコロニーを検体とする。今回の事例では、菌分離はできなかつたため、増菌培養液の上清を用いて実施したところ、敷料1箇所の検体からD/Cモザイク型毒素遺伝子が検出された。

診 断

一般病性鑑定及びボツリヌス検査において、7月の症例では、野鳥糞便のみボツリヌスD型毒素が検出され、牛由来材料からは非検出であった。しかし臨床症状などから牛ボツリヌス症を疑い、ワクチンを起立不能牛以外全頭に接種、その後続発がなかつたことから、牛ボツリヌス症であった可能性が高いと考える。

1月の症例では、死亡牛直腸便は型別不明となったものの、採材後に起立不能となった同一房同居牛および敷料からD型毒素が検出されたことや、発症牛の大半がワクチン未接種牛だったことから、牛ボツリヌス症と診断した。さらに、毒素遺伝子型別PCRで敷料からD/Cモザイク型毒素遺伝子が検出されたことや、毒素中和法による型別でもCおよびD型両方のマウスが生存したことから、本症例にはD/Cモザイク型毒素産生株が関与していたものと考えられた。

考 察

牛ボツリヌス症の症例では、必ずしも発症牛からB o N Tやその遺伝子が検出されているわけではなく、発症牛や環境材料を含む検体からのB o N T遺伝子の検出率は、数%~30%というデータもある⁵⁾。今回の7月の事例では牛由来材料からは検出されなかつた。本事例は、毒素ではなく菌（芽胞）を経口摂取し、消化管内で発芽・増殖した菌が産生したB o N Tが吸収され、血行性に末梢神経に達して発症したものと思われ、芽胞を摂取してから発症までタイムラグがあると考えられる。腸管内で栄養型菌ばかりになった場合や、菌数が少ない場合などは、当所が実施している検査法（芽胞を増菌培養液中で加熱により発芽・増殖させ、十分にB o N Tを産生させてから検出することを想定）では、増菌培養しても十分な量のB o N Tが産生されない可能性があると考えられる。また、牛床等の環境の汚染度が低い場合、複数箇所をプールした材料では、検出できない可能性がある。このような場合、1月の事例のように、見かけ上健康な同居牛も採材することで、体内に摂取された芽胞や菌数が減少する前に検査に供することができ、培養上清に十分量のB o N Tを産生させることができる。

また、今回のようなモザイク型毒素による牛ボツリヌス症でも、検体中のB o N T量が十分ならば

毒素の型別は可能である。しかし、検体中のB o N T量が微量の場合、C型抗血清でも一部中和されてマウスが生存するなど、判定不能となることもある。1月の事例で毒素型別が「型別不能」や「判定不能」となったのは、毒素検査時には致死量を越えるB o N Tが検体に含まれていたためにマウスは特有症状を示して死亡したが、毒素型別を実施するまでの準備に時間がかかり、培養上清中のB o N Tが分解され、マウス致死量を下回ったためと思われる。

今後、牛ボツリヌス症をより確実に診断するため、採材時には、発症牛だけでなく未発症同居牛も必ず採材することが重要である。初発生農場など、環境汚染度が低いと思われる農場では、敷料は個別に検査するのが望ましいと考える。また、検査においては、保存時に毒素が減少しないよう希釈濃度を調整するなど、培養上清の保存方法を検討し、検査精度を上げてゆきたい。あわせて、可能な限り毒素検査と毒素型別を同時並行で実施するなど、臨機応変に手順を変更し、迅速な診断につとめたい。

謝辞：毒素型別PCR及び菌分離を実施していただいた、大阪府立大学生命環境科学研究科獣医感染症学研究室の幸田知子先生に深謝いたします。

引用文献

- 1) 函城悦司：MPアグロジャーナル、No.6、12-19（2011）
- 2) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 細菌検査マニュアル http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/bacteria_man/botulinus/index.html
- 3) 小崎俊司、幸田知子、中村桂司：家畜診療、59巻3号、131-138（2012）
- 4) Nakamura K et al.：Veterinary Microbiology、140、147-154（2010）
- 5) 田原鈴子、澤田勝志：日獣会誌、68、629-633（2015）

浮腫病・豚大腸菌症履歴農場での大腸菌病原因子及び薬剤耐性調査

県央家畜保健衛生所

齋藤 匡人 横澤 ころろ
池田 知美 亀井 勝浩
荒木 尚登 和泉屋 公一

はじめに

浮腫病は志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*、以下STE C) に属する大腸菌が引き起こす浮腫や神経症状、急死を主徴とする疾病で、主に離乳後の子豚に好発する。浮腫病を引き起こすSTE Cは小腸への定着に關与する定着因子F18及びF4並びに症状に關与する毒素因子Stx2eを病原因子として保有しており、保菌母豚糞便中や環境中に含まれるSTE Cの経口摂取により子豚が保菌すると考えられている¹⁾²⁾。昨年、当所管内の複数の農場で浮腫病を疑う病性鑑定事例が散発的に発生し、病性鑑定豚からはStx2e陽性のSTE Cが分離された。分離したSTE Cについて、農場使用薬剤を中心に薬剤感受性試験を実施したところ、全ての分離株が複数の薬剤に耐性を持つ多剤耐性菌であり、ほとんどの農場使用薬剤に耐性を示す株も認められた。そこで、浮腫病が発生していない平時において健康母豚由来大腸菌の病原因子保有状況及び薬剤耐性状況を調査したので、その概要を報告する。

材料と方法

当所管内で過去に浮腫病や大腸菌症の關与が疑われた病性鑑定事例のある6農家を調査対象とした(表1)。分娩前後の臨床的に健康な繁殖母豚5頭から排泄直後の落下糞便又は直腸スワブを採材し、DHL寒天培地で塗抹培養後、赤色変化を示した大腸菌を疑うコロニーを5個釣菌し、羊血液寒天培地とX-MG寒天培地に接種した。培養後、X-MG寒天培地上で青色コロニーを形成したものの中から、羊血液寒天培地上で溶血性が有れば該当コロニーを、

表1 対象農家

農家	形態	母豚	毒素*	定着因子*
A	一貫	151	ST2, LT1	-
B	一貫	64	VT	-
C	一貫	551	ST2, VT	F4
D	一貫	81	Stx2e	F18
E	一貫	40	Stx2e	F18
F	一貫	135	ST1	-

*過去病性鑑定時に検出

無い場合は任意のコロニーを選択し、A p i R a p i D20Eを用いて大腸菌と同定した。得られた大腸菌はT S A培地で純培養後、ミューラーヒントン寒天培地を用いて表 2 に記載した 13 薬剤について一濃度ディスク法により薬剤感受性試験を実施した。また、農家毎の母豚 5 頭分の純培養大腸菌株をプールして病原因子 S t x 2 e、F 18 及び F 4 について P C R 法により遺伝子検索を実施した。

表 2 薬剤感受性試験実施薬剤

分類	薬剤名	略称	分類	薬剤名	略称
ペニシリン系	アンピシリン	ABPC	サルファ剤/ ピリミジン系	スルファメトキサゾール・ トリメプリム合材	ST
	アモキシシリン	AMPC			
セフェム系	セフォタキシム	CTX	キノロン系	ナリジクス酸	NA
アミノグリコシド系	カナマイシン	KM	フルオロキノ ロン系	エンロフロキサシン	ERFX
	ストレプトマイシン	SM		オルビフロキサシン	OBFX
	ゲンタマイシン	GM		ノルフロキサシン	NFLX
テトラサイクリン系	オキシテトラサイクリン	OTC	ペプチド系	コリスチン	CL

成 績

6 農家 30 頭の母豚から分離した大腸菌のうち計 35 株の大腸菌を選択し、病原因子検索及び薬剤感受性試験に供した。各農家母豚 5 頭分の純培養大腸菌株をプールして S t x 2 e、F 18 及び F 4 につ

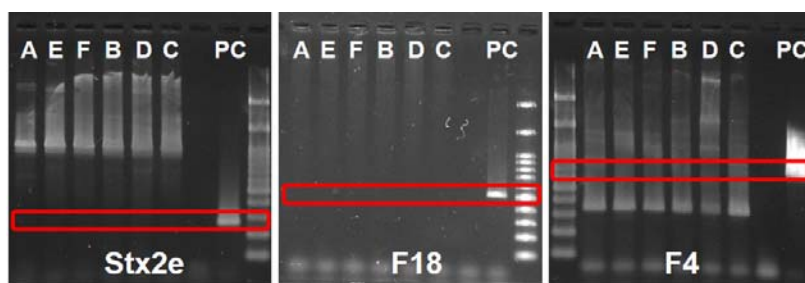


図 1 S t x 2 e、F 18、F 4 遺伝子検索結果

ついて P C R を実施したところ、全ての検体で S t x 2 e、F 18 及び F 4 遺伝子は検出されなかった (図 1)。

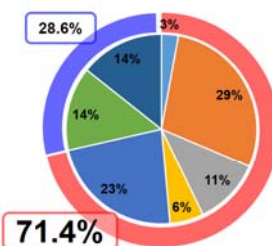
薬剤感受性試験結果について、35 株全ての薬剤耐性パターンは、全ての薬剤に感受性の株が 5 株 (14.3%)、一つの薬剤にのみ耐性が認められる単剤耐性株が 5 株 (14.3%) であったのに対し、2 剤以上の薬剤に耐性を持つ多剤耐性菌は 25 株と全体の約 71.4% を占めた。最も多い耐性パターンは 5 剤耐性で 10 株 29%、最も多くの薬剤に耐性を持っていた株は 7 剤耐性株であった。全体の平均薬剤耐性数は 2.9 剤であったが、農家毎の平均薬剤耐性数は 4.6 剤から 1.3 剤と差が認められた (図 2)。

薬剤毎の耐性率は、耐性率が高い薬剤から順にSM74%、OTC57%、ST合剤49%、ABPC40%、AMPC40%であった。特にSMでは耐性及び中間と判定された株を合わせると100%となり、感受性と判定された株は認められなかった。また、耐性率は低いが、二次選択薬であるCTXやOBFXに耐性を持つ株も認められた。

ABPC、CTX、KM、SM、GM、OTC、CL、ST及びNA(図3において枠で囲った薬剤)について、我が国の家畜衛生分野における薬剤耐性モニタリング体制(以下、JVARM)での平成27年度家畜由来細菌(大腸菌)の抗菌性物質感受性実態調査結果³⁾と比較した。JVARMの調査ではST合剤の調査を実施していないため、トリメトプリムに対する耐性率を参考とした。ほとんどの薬剤でJVARMにおける調査結果と類似した耐性傾向であったが、SM及びST剤ではJVARMにおける耐性率のおよそ2倍と高い耐性率であった(図3)。

■薬剤耐性パターン

耐性数	株数
耐性なし	5
単剤耐性	5
2剤耐性	8
3剤耐性	2
4剤耐性	4
5剤耐性	10
7剤耐性	1



■平均薬剤耐性数

全農家	A農家	B農家	C農家	D農家	E農家	F農家
2.9剤	4.6剤	1.3剤	3.8剤	3.2剤	2.2剤	1.6剤

図2 薬剤耐性パターンと平均薬剤耐性数

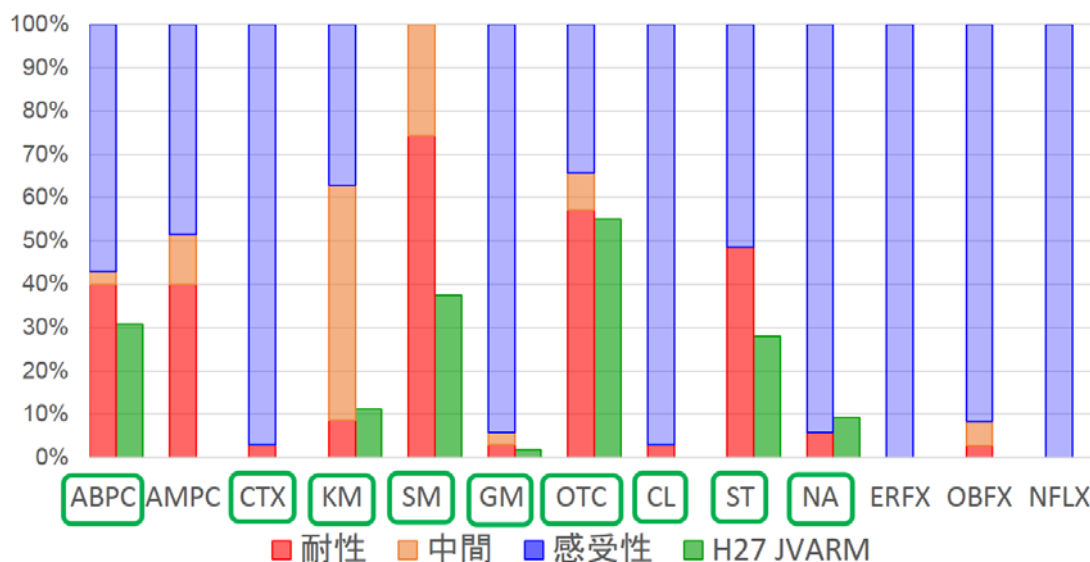


図3 薬剤別耐性率とJVARM調査との比較

農家毎に各薬剤の薬剤耐性率と使用薬剤の関係を表3に示した。飼料添加している薬剤に着目すると、A農家では使用している4薬剤全てで耐性率が50%を上回った。B農家では5薬剤中1薬剤で、C農家では4薬剤中3薬剤で、D農家では1薬剤中1薬剤で、E農家では5薬剤中2薬剤で、F農家

では2薬剤中1薬剤で耐性率が50%を上回り、全体では延べ21薬剤中12薬剤(57.1%)で耐性率が50%を上回った。一方、治療薬としてのみ使用している薬剤に着目すると、耐性率が50%を上回ったのは、全体で延べ13薬剤中2薬剤(15.3%)だけであった。また、二次選択薬であるCTXやOBFXに耐性株が認められた農家では、CTXと同じ第三世代セフェム系抗菌剤であるセフトオフルや、OBFXと同じフルオロキノロン系抗菌剤であるERFXを治療薬として使用していた。

表3 農家毎の薬剤別耐性率(%)と使用薬剤の比較

薬剤	A農家	B農家	C農家	D農家	E農家	F農家
ABPC	88*	14*	40*	40***	20*(40)	20
AMPC	88*	14*(42.9)	40*(60)	40***	20*(40)	20
CTX	0**	0	0	0	0	20**
KM	25(75)	0(85.7)	0(20)	20	0(100)	0(60)
SM	100	57(100)	100	80(100)	60(100)	40(100)
GM	0	0	0	20	0(20)	0
OTC	63(100)	29	40	80	80	60
CL	0	0	0	20	0	0
ST	100	14	100	20	40	0
NA	0	0	40	0	0	0
ERFX	0	0	0	0	0	0
OBFX	0(12.5)	0	20(40)	0	0	0
NFLX	0	0	0	0	0	0

太字
… 飼料添加している薬剤
… 治療に使用している薬剤

*:農場ではペニシリンを飼料添加

**：農場では同世代のセフトオフルを使用

***:農場ではペニシリンを使用

()内は中間もしくは耐性となり感受性と判定されなかった割合

考 察

今回の調査では、母豚から分離した大腸菌から病原因子は検出されず、STECは分離されなかった。健康母豚からのSTEC検出に関する報告は多くはないが、浮腫病発生農場における母豚糞便からの浮腫病病原因子検出に関する報告によると、浮腫病発症期の母豚糞便117頭でのStx2e保有率が47%であるのに対し、浮腫病終息後の母豚糞便106頭ではStx2eは検出されなかった⁴⁾とのことであり、平時ではたとえSTECを保菌していたとしても、STECを分離することは容易ではないと考えられる。また、薬剤感受性を調査するために、本調査では母豚1頭あたり1株もしくは2株の大腸菌についてのみPCR法による病原因子検索を実施したが、STECを保菌す

る母豚のスクリーニングだけを目的とするのであれば、既報に順じてPCR法に供するコロニー数を増やす、浮腫病発生時期に母豚の調査を実施する等の工夫が必要と思われる。

また、平成29年に病性鑑定を実施した2農家において、病豚由来STECと本調査で分離した中で最も耐性薬剤数が多い株を比較したところ、感受性の異なる薬剤は認められるものの、薬剤耐性パターンに大きな差は認められなかった(表4)。このことから、平時から、農場の薬剤感受性状況を把握しておくことは、使用薬剤の有効性を判断する上で有用と考えられる。

使用薬剤と薬剤感受性の関係につ

表4 病豚由来株と健康豚由来株の薬剤感受性比較

いては、今回の結果からも、全体的に飼料添加している薬剤では薬剤耐性率が高くなる傾向で、治療薬としてのみ使用している薬剤では感受性となる傾向が認められた

農家		PC	ABPC	SM	GM	OTC	CL	ERFX
D	病性鑑定豚由来株	R	-	I	S	R	R	S
	健康母豚由来株(*)	-	R	R	R	R	S	S
E	病性鑑定豚由来株	R	R	R	-	R	R	S
	健康母豚由来株(*)	-	R	R	S	R	S	S

(*)分離された株の中で最も耐性数の多い株を記載

ことから、病畜発生時等に使用する治療薬より、一定期間飼料添加して使用する薬剤の方が耐性菌の選択圧は強くなると推察された。浮腫病や大腸菌症を引き起こす病原性大腸菌は、非病原性大腸菌よりも多剤耐性傾向を示すため、非病原性大腸菌の薬剤耐性を放置すると、疾病発生時に抗菌性物質による治療の選択肢を狭めることにつながる恐れがある。耐性率が高い薬剤については、添加の有無や添加期間、異なる薬剤の使用等を検討し薬剤感受性の回復を図る必要があるが、新たな薬剤耐性菌が生じないような薬剤の慎重使用、更には薬剤の使用を必要最低限とするための飼養衛生管理の徹底は疾病をコントロールする上で必要不可欠である。平成28年4月の薬剤耐性対策アクションプラン策定以降、畜産分野における薬剤耐性対策の重要性が声高に叫ばれている情勢を鑑み、人医療分野への影響が生じないよう、また、なにより家畜への抗菌剤の有効性を確保するためにも、本調査結果を生かし、家畜保健衛生所として必要な衛生指導を行っていくことで薬剤耐性対策に取り組んでいきたい。

引用文献

- 1) 小林秀樹：All About Swine、28、16-22 (2006)
- 2) 末吉益雄：豚病会報、48、7-13 (2006)
- 3) 動物医薬品検査所ホームページ：平成27年度の調査結果の概要について (2016)
- 4) 鈴木幹一郎：日本獣医師会学会関係情報、68、716-717