

# 8 乳房炎原因菌のバイオフィルム形成能調査と乳房炎対策の検討

中央家畜保健衛生所

浦川 了・岩永 政弘

## 1 はじめに

近年、ヒトの臨床現場において、消毒薬や抗生物質で殺菌できないバイオフィルム（BF）形成菌が院内感染により難治性の感染症を引き起こすことが問題となっている<sup>5)</sup>。

産業動物分野においても、牛乳房炎由来細菌のBF形成能に関する報告があり、難治性乳房炎の原因の1つではないかと考えられている<sup>7)</sup>。

今回、管内の乳用牛飼養農場における乳房炎原因菌のBF形成能の有無について調査した。

## 2 乳房炎原因菌及び牛舎環境菌のBF形成能調査

### (1) 材料及び方法

7戸39頭の乳房炎乳汁62検体から分離された75株（うち38株は難治性乳房炎乳汁由来）及び乳房炎多発農家の牛舎環境材料13検体から分離された10株を材料とし、試験管法によりBF形成能を確認するとともに、簡易的にBF形成能を確認することができるかを検証するため、コンゴレッドアガー法（CRA法）及び変法コンゴレッドアガー法（MCRA法）でも確認した<sup>2,3,4,6)</sup>。

### (2) 分離菌の内訳

乳汁から分離された75株のうち全体の48株（64%）が黄色ブドウ球菌（S.a）及び黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌（ブ菌）であった。また、難治性乳房炎乳汁由来株38株のうち、S.a及びブ菌が30株（79%）であった。環境材料からはS.aが1株、ブ菌が9株分離された（表-1）。

表-1 検体材料からの分離菌内訳

菌種	S.a	ブ菌	その他	計
乳汁	16株 (21%)	32株 (43%)	27株 (36%)	75株 (100%)
難治性乳汁	12株 (32%)	18株 (47%)	8株 (21%)	38株 (100%)
環境材料	1株 (10%)	9株 (90%)		10株 (100%)

S.a: 黄色ブドウ球菌  
ブ菌: 黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌

### (3) 乳汁由来株のBF形成能調査成績

75株中BF陽性は66株（88%）であった。

難治性乳房炎由来38株ではBF陽性は36株（95%）であった（表-2）。

また、試験管法とCRA法及びMCRA法を比較した結果、S.aについては試験管法で陽性の株は全株MCRA法で黒色コロニーが確認された。

ブ菌については、試験管法陽性株はMCRA法で黒又は黒ピンクコロニーが確認された。

その他の菌種については、試験管法陽性株はCRA法、MCRA法で様々な色のコロニーが確認された（表-3）。

表-2 乳汁由来株のBF形成能調査成績

検体	BF+	BF-	計
	66株(88%)	9株(12%)	75株(100%)
難治性	36株(95%)	2株(5%)	38株(100%)
難治性以外	30株(81%)	7株(19%)	37株(100%)

表 - 3 検査法ごとのBF形成能調査成績(菌種別)

S.a					
試験方法	検数	CRA法	MCR法	検数	
+	16	黒色	5	黒色	16
		黒ピンク	10	黒ピンク	0
		ピンク	1	ピンク	0
ブ菌					
試験方法	検数	CRA法	MCR法	検数	
+	26	黒色	3	黒色	13
		黒ピンク	17	黒ピンク	13
		ピンク	4	ピンク	0
		その他	6	その他	6
-	6	黒色	3	黒色	7
		黒ピンク	5	黒ピンク	5
		様々	16	様々	12
その他					
試験方法	検数	CRA法	MCR法	検数	
+	24	黒色	3	黒色	7
		黒ピンク	5	黒ピンク	5
		様々	16	様々	12
-	3	ピンク	3	ピンク	3



(4) 環境材料由来株のBF形成能調査成績

乳房炎多発農場の環境材料 13 検体からは、10 検体から S.a 1 株、ブ菌 9 株が分離され、全株 BF 陽性であった(図 - 1, 表 - 4)。

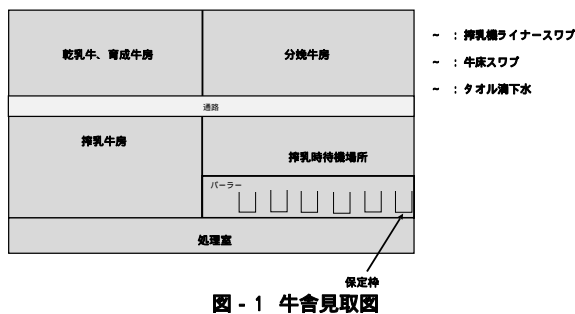


図 - 1 牛舎見取図

表 - 4 環境材料由来株のBF形成能調査成績

検体No.	採材場所	分離菌	BF形成能
	搾乳機 1 ライナー	ブ菌	+
	搾乳機 2 ライナー	ブ菌	+
	搾乳機 3 ライナー	S.a	+
	搾乳機 4 ライナー	ブ菌	+
	搾乳機 5 ライナー	ブ菌	+
	搾乳機 6 ライナー	ブ菌	+
	牛床 1	ブ菌	+
	牛床 2	ブ菌	+
	牛床 3	ブ菌	+
	牛床 4	ブ菌	+
	タオル 1	-	NT
	タオル 2	-	NT
	タオル 3	-	NT

3 BF 形成能と薬剤耐性率

乳汁由来 75 株について 1 濃度ディスク法により薬剤感受性試験を実施した。SM、KM、PCG、EM については BF 形成能陽性、陰性に関わらず高い耐性率であった(図 - 2)。

難治性乳房炎乳汁由来株、難治性以外の乳房炎乳汁由来株についても同様の耐性傾向であった(図 3)。

分離菌のうち、S.a は SM、KM、EM に耐性の株が多い傾向であったが、難治性由来以外の株が少ないため、難治性と薬剤耐性の関連性は不明であった(図 4)。

ブ菌は難治性がそうでないかに関わらず、SM、

KM、PCG、ABPC、EM に耐性の株が多い傾向であったが、BF 形成能陰性株が少ないため、BF 形成能と耐性率の関連性は不明であった(図 5)。

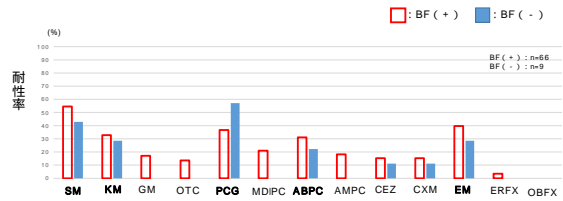


図 - 2 BF 形成能と薬剤耐性率(全体)

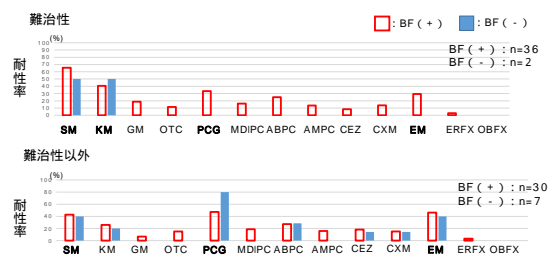


図 - 3 BF 形成能と薬剤耐性率(難治性、難治性以外)

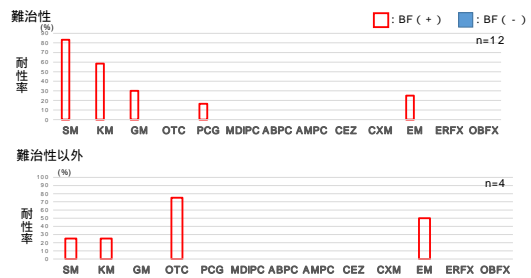


図 - 4 BF 形成能と薬剤耐性率(S.a)

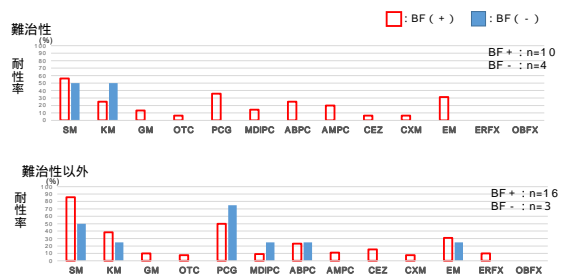


図 - 5 BF 形成能と薬剤耐性率(ブ菌)

4 BF 形成菌に対する消毒薬の有効性試験

環境材料から分離された BF 形成能を有する S.a 10 株、ブ菌 10 株について、市販酪農機器専用殺菌剤及び洗剤を用い、農場における消毒工程に近い方法での有効性試験を実施した。

その結果、消毒後の菌分離は陰性であったこ

とから、今回用いた消毒薬の有効性が確認された。

## 5 S.aの遺伝子解析

### (1) 材料及び方法

S.a16株(乳房炎乳汁由来15株、環境材料由来1株)について、パルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)を実施し、遺伝子切断パターンを確認した。加えて、このうち代表株5株について Multilocus sequence typing (MLST) を実施した<sup>1)</sup>。

### (2) 結果

PFGEの結果、4農場から分離された乳房炎乳汁由来株は全て同様の遺伝子切断パターンであり、環境材料由来株は乳房炎乳汁由来株とは異なる切断パターンであった。

MLSTの結果、乳房炎乳汁由来株は全て、反芻獣から頻繁に分離される sequence type(ST)352であり、環境材料由来株は、ヒト由来株で頻繁に確認されるST8であった。(図-6)

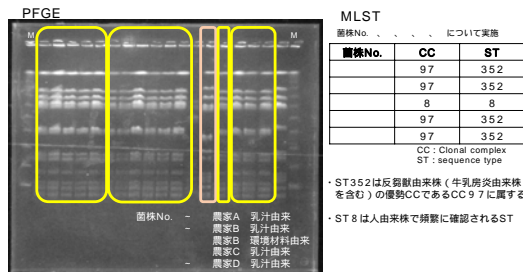


図-6 S.aの遺伝子解析結果

## 6 まとめ及び考察

今回初めて管内の乳用牛飼養農場の乳房炎原因菌についてBF形成能調査を実施したところ、分離された乳房炎原因菌の88%がBF形成能を有していた。うち、難治性乳房炎原因菌の95%がBF形成能を有しており、BF形成が難治性乳房炎の原因となりうると思われる。なお、乳房炎原因菌がBF形成能を有していても治癒している個体があり、その要因については更なる検討が必要と思われる。

薬剤感受性試験の結果、BF形成能と薬剤耐性率には明らかな関連性が認められなかった。これは、供試菌が少なかつたためと思われる。ま

た、BF形成前に細菌が薬剤に暴露されたためとも考えられた。臨床現場において、難治性乳房炎に、感性薬剤を投与しても効果が認められないことがあることから、難治性乳房炎に対する有効薬剤の選択については、薬剤感受性試験のみでなく、BF撲滅濃度等さらなる検討が必要と思われる。

洗浄後の搾乳機ライナーからS.aが分離されたが、消毒薬がBF形成能を有する細菌にも有効であった。その遺伝子解析の結果、乳汁由来とは異なるクローン由来であり、人由来株で頻繁に確認されるSTであったことから、人為的な汚染が示唆された。

これらのことから、BF形成菌が原因菌である難治性乳房炎対策には、薬剤感受性試験に加え、さらなる試験を実施して薬剤を選定する必要がある。加えて、基本的な衛生管理の徹底や搾乳機の洗浄後の取扱いも重要と思われる。

## 7 参考文献

- 1) Hata *et al*: Characteristics and Epidemiologic Genotyping of *Staphylococcus aureus* Isolated from Bovine Mastitic Milk in Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 68(2), 165-170, 2006
- 2) Johannes *et al*: Evaluation of different detection methods of biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. *Med Microbiol Immunol*, 191, 101-106 (2002)
- 3) Kaiser *et al*: Modification of the Congo red agar method to detect biofilm production by *Staphylococcus epidermidis*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 75, 235-239 (2013)
- 4) Mariana *et al*: Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research*, 3(6), 330-338, (2009)
- 5) 水之江義充ら: バイオフィルム感染症制圧

に向けての展望,家畜感染症学会誌,5,113-118  
(2016)

6) Reddy *et al*: Tube Adherence Test as a  
Screening Tool for Detection of Biofilm Fo  
rmation among *Staphylococcus aureus*. Int.J.  
Microbiol.App.Sci. 6 ( 8 ),1325-1329 (2017)

7) 山下祐輔: 牛の乳房炎とバイオフィルム,臨  
床獣医,35,19-26 (2017)