

牛の臨床型乳房炎乳汁から分離された *Klebsiella* および *Escherichia coli* の各種抗菌剤に対する感受性

野村 武・宇佐美佳秀・菊池 直哉・高橋 樹史・平棟 孝志・梁川 良

Antibiotics Susceptibility of *Klebsiella* and *Escherichia coli* Strains Isolated from Milk of Cows Affected with Clinical Mastitis

Takeshi NOMURA, Yoshihide USAMI, Naoya KIKUCHI, Tatsufumi TAKAHASHI, Takashi HIRAMUNE, and Ryo YANAGAWA
(June, 1994)

結 論

Klebsiella や *Escherichia coli* (*E. coli*) などの腸内細菌科に起因する乳房炎は、分娩前後の高泌乳牛に多発し、急死例が多く、回復しても罹患乳房の泌乳量は減少するか停止するため、廃用となり経済的損失が大きい¹⁾。わが国でも、このような乳房炎が増加傾向にあり^{3-5,9)}、治療時に、どの薬剤を使用するかが問題となる。乳房炎乳汁から分離されたグラム陰性菌の薬剤感受性の報告^{6,7)}はあるが、腸内細菌科に対する各種抗菌剤の最小発育阻止濃度(MIC)は、わが国では調べられていない。そこで、今回、牛の臨床型乳房炎乳汁から分離された *Klebsiella* および *E. coli* 菌株について MIC を測定するとともに耐性化の原因の一つである β ラクタマーゼ保有率を調べた。

材料と方法

1. MIC の測定

1) 供試菌株

Klebsiella 88 株および *E. coli* 101 株を供試した。これらは主として 1985 年から 1988 年の間に北海道、岩手県、兵庫県の牧場で発生した牛の臨床型乳房炎の乳汁から分離され、Cowan²⁾ の記載に基づいて同定されたものである。また、薬剤感受性試験の対照菌株として *Staphylococcus aureus* 209 P 株および *E. coli* NIHJ 株を用いた。

2) 供試薬剤

牛の乳房炎の治療に臨床応用されている抗菌剤を中心

に選択した 18 剤を用いた (表 1)。

Table 1. Antimicrobial drugs used

Penicillins	Benzympenicillin	(PCG)
	Ampicillin	(ABPC)
	Piperacillin	(PIPC)
	Cloxacillin	(MCIPC)
	Dicloxacillin	(MDIPC)
Cephalosporin	Cefazolin	(CEZ)
	Ceftizoxim	(CZX)
Aminoglycosidic antibiotics	Gentamycin	(GM)
	Kanamycin	(KM)
	Streptomycin	(SM)
Macrolides	Erythromycin	(EM)
	Oleandomycin	(OL)
Tetracyclines	Tetracycline	(TC)
	Oxytetracycline	(OTC)
	Minocycline	(MINO)
Peptide antibiotics	Colistin	(CL)
	Polymyxin B	(PL)
Others	Chloramphenicol	(CP)

3) 感受性測定

日本化学療法学会の定める MIC の測定標準法⁸⁾ に従い、寒天平板希釈法によった。

培地：感受性測定用寒天培地 (ニッスイ) を用いた。

薬剤の希釈濃度：各平板培地 1 ml 当りに含まれる薬

剤の濃度は、100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, 0.78, 0.39, 0.20, 0.10, 0.05, 0.025 $\mu\text{g}\cdot\text{U}$ (力価) とした。なお、100 $\mu\text{g}\cdot\text{U}$ 以上の濃度を使用する場合は 200, 400 および 800 $\mu\text{g}\cdot\text{U}$ とした。対照として薬剤を含まない培地を用いた。

増菌用培地：トリプトソーヤブイヨン (ニッスイ) を使用した。

接種菌液：増菌用培地に 24 時間培養後、同培地で 10^6 /ml の菌数に調整した。

菌の接種法：マイクロプランター (MIT-P: 佐久間製作所) を使用し、各菌株調整液の 0.005 ml を感受性測定用培地に接種した。

培養時間と温度：37°C で 20 時間培養した。

判定：増殖が完全に阻止されたか、あるいは対照培地に比較し明らかに増殖が劣る最小濃度を MIC とした。集落が 1 個のみ発育した場合、阻止と判定した。

2. β ラクターマーゼ検査法

ブロームクレゾールパープル (BCP) およびペニシリン G (PCG) 50 U/ml 力価を含有するディスク (台糖ファイザー) を用いた。このディスクを 0.01 M リン酸緩衝液に浸した後、トリプチケース寒天培地 (BBL) に純培養した菌の 1 エーゼを直接画線し 15 分間静置した。陰性対照ディスクの画線部分が紫のまま、BCP および PCG 含有ディスクの画線部分が黄変した場合、 β ラクターマーゼ陽性と判定した。

成 績

1 MIC の測定値

Klebsiella に対する CEZ, CZX, GM, PL の 4 薬剤の MIC₉₀ 値は 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で、高感受性であった。次いで KM, CP, CL の MIC₉₀ 値は 3.13-6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で感受性、PICP, MINO, CL のそれは 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で中等度感受性であった。本菌が抵抗性を示したのは PCG, MCIPC, MIDPC, SM, EM, OL, TC, OTC で MIC₉₀ は 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を示した (表 2)。

Klebsiella に対する MIC の分布が 2 峰性を示したのは PCG (3.13 および 25 U/ml), ABPC (6.25 および 100 U/ml), SM および KM (それぞれ 1.56 および 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), OTC (3.13 および 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) であった。3 峰性を示したのは TC (3.13, 25, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および CP (1.56, 100, 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) であった。

E. coli に対する CEZ, CZX, GM, PL の 4 薬剤の MIC₉₀ 値は 1.56 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で、高感受性であった。次いで KM, MINO, PIPC の MIC 値は 3.13-6.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で

感受性、ABPC, CL のそれは 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で中等度感受性であった。本菌が抵抗性を示したのは PCG, MCIPC, MDIPC, SM, EM, OL, TC, OTC, CP で、MIC₉₀ は 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を示した。

Table 2. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of 18 antimicrobial drugs to *Klebsiella* isolated from bovine mastitic milk

Antimicrobial drugs	MICs ($\mu\text{g}\cdot\text{U}/\text{ml}$)		
	Ranges		MIC ₉₀
Benzylpenicillin	1.56	~>800	200
Ampicillin	0.20	~>800	50
Piperacillin	0.20	400	12.5
Cloxacillin	50	~>800	400
Dicloxacinil	400	~>800	>800
Cefazolin	0.1	~ 50	1.56
Ceftizoxim	0.025~	0.1	0.025
Gentamycin	0.1	~ 1.56	0.78
Kanamycin	0.39	~ 800	3.13
Streptomycin	0.39	~ 400	400
Erythromycin	3.13	~ 200	100
Oleandomycin	100	~>800	>800
Tetracycline	0.78	~ 200	200
Oxytetracycline	0.39	~ 400	200
Minocycline	0.19	~ 50	25
Colistin	6.25	~ 100	25
Polymyxin B	0.20	~ 3.13	0.78
Chloramphenicol	0.78	~ 100	6.25

E. coli に対する MIC の分布が 2 峰性を示したのは PCG (25 および 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ABPC (3.13 および 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$), SM (3.13 および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), MINO (0.78 および 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$), CP (6.26 および 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) であった。3 峰性を示したのは PIPC (1.56, 12.5, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$), TC (1.56, 25, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) であった。

2 β ラクターマーゼ保有株数の割合

Klebsiella 88 株中 44 株 (50%) が、また、*E. coli* 101 株中 4 株 (4.0%) が β ラクターマーゼを保有していた。

Table 3. Minimum inhibitory concentrations (MICs) of 18 antimicrobial drugs to *E. coli* isolated from bovine mastitic milk

Antimicrobial drugs	MICs ($\mu\text{g. U/ml}$)		
	Ranges		MIC ₉₀
Benzylpenicillin	3.13	~>800	100
Ampicillin	0.78	~>800	50
Piperacillin	0.39	~ 50	6.25
Cloxacillin	100	~>800	400
Dicloxacillin	>800		>800
Cefazolin	0.39	~ 50	1.56
Ceftizoxim	<0.025	~ 0.1	<0.025
Gentamycin	0.39	~ 1.56	0.78
Kanamycin	0.78	~ 400	3.13
Streptomycin	1.56	~ 400	400
Erythromycin	100	~ 400	200
Oleandomycin	>800		>800
Tetracycline	1.56	~ 200	200
Oxytetracycline	0.78	~ 800	400
Minocycline	1.56	~ 50	6.25
Colistin	25	~ 50	50
Polymyxin B	0.20	~ 6.25	0.39
Chloramphenicol	1.56	~ 400	400

考 察

腸内細菌科による乳房炎罹患牛は、元気消失、食欲不振、発熱ならびに乳房の腫脹、硬結、疼痛、紫斑、ガスの排出、血乳などの臨床症状を伴い、病勢は甚急性で死亡率も高い。そこで早期に診断し効果的な療法を試みる必要がある。このような見地から臨床型乳房炎乳汁由来 *Klebsiella* 88 株および *E. coli* 101 株に対する 18 種抗菌剤の MIC を測定し、次いで耐性機序の一つである β ラクタマーゼ保有菌株の割合を調べた。

まず、*Klebsiella* および *E. coli* ともに高感受性を示した抗菌剤は CEX, CEZ, GM および PL で MIC₉₀ 値は 1.56 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった。この薬剤の MIC の分布はいずれも 1 峰性で耐性菌の出現はなかった。しかし、GM は高価な点で、また、PL は腎障害の副作用のある点で臨床応用は期待できないと思われる。

従来、牛の乳房炎治療によく用いられた β ラクタム系、テトラサイクリン系やマクロライド系の MIC₉₀ 値は概して高く、マクロライド系を除きその分布も 2 ないし 3 峰性を示し耐性菌の出現が見られた。

β ラクタマーゼ保有株が *Klebsiella* で 50%, *E. coli* で 4% あり、これが β ラクタム系の耐性菌の原因の一つと考えられる。しかし、各種薬剤に対し耐性を示した菌株の遺伝学的性状すなわち染色体性、プラスミド性などについて検査していないので、今後、この点の検討が必要であろう。

以上の成績から *Klebsiella* や *E. coli* に起因する甚急性乳房炎の治療にはセファロsporin 系が効果的と思われ、実際に同薬剤を臨床応用した成績は近く公表の予定である。

要 約

牛の臨床型乳房炎乳汁から分離された *Klebsiella* 88 株および *Escherichia coli* 101 株に対する 18 種の抗菌剤の最小発育阻止濃度を測定し、さらに、それら菌株が β ラクタマーゼを保有するか否かを調べた。

1. *Klebsiella* 88 株および *E. coli* 101 株は、セファゾリン、セフトイゾキシム、ゲンタマイシン、カナマイシンおよびポリミキシン B に対し、感受性 (MIC₉₀ が 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 以下) であった。中等度感受性 (MIC₉₀ が 6.25-50 $\mu\text{g/ml}$) はアンピシリン、ピペラシリン、ミノサイクリンおよびコリスチンの 4 薬剤で見られた。ベンジルペニシリンなど他の 9 薬剤の MIC₉₀ は 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上であった。

2. β ラクタマーゼ保有率は、*Klebsiella* 88 株中 44 株 (50%), *E. coli* 101 株中 4 株 (4.0%) であった。

文 献

- Coliform subcommittee of the research committee of the national mastitis council, 1979: Coliform mastitis—A review. J. Dairy Sci, 62: 1-22.
- Cowan, S. T. 1973: 医学細菌同定の手びき。坂崎利一訳, pp. 139-157, 近代出版, 東京。
- 函城悦司, 1988: 大腸菌群による乳房炎の発症機序と対策。家畜診療, (301): 5-15.
- 函城悦司, 春海礼二, 余田岬, 蓬萊英造, 西剛, 皆木敏夫, 伊藤郁夫, 久米常夫, 1980: 乳牛の壊疽性乳房炎に関する研究 I. 日獣会誌, 33: 319-324.
- 函城悦司, 蓬萊英造, 入谷晋市, 柏崎守, 久米常夫, 1980: 乳牛の壊疽性乳房炎に関する研究 II. 日獣会

- 誌, 33 : 485-489.
- 6) Mackie, D. P., Logan, E. F., Pollock, D. A., Roders, S. P. 1988 : Antibiotic sensitivity of bovine staphylococcal and coliform mastitis isolated over four years. *Vet. Rec.*, 123 : 515-517.
- 7) McDonald, J. S., McDonald, T. J and Anderson, A. J. 1977 : Antimicrobial sensitivity of aerobic gram-negative rods isolated from bovine udder infections. *Amer. J. Vet. Res.*, 38 : 1503-1507.
- 8) 三橋進, 1981 : 最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について. *Chemotherapy*, 29 : 76-77.
- 9) 野村武, 1986 : グラム陰性菌による甚急性乳房炎の実態とその治療. *家畜診療*, (282) : 21-40.

Summary

1. We determined minimum inhibitory concentration (MIC) of 18 antimicrobials to *Klebsiella* and *Escherichia coli* strains isolated from milk of cows affected with clinical mastitis. Eighty-eight strains of *Klebsiella* and 101 of those of *E. coli* were susceptible to cefazolin, ceftizoxim, gentamicin, kanamycin, and polymixin B ; all strains were inhibited at a concentration of less than 3.13 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Four drugs (ampicillin, piperacillin, minocycline, and colistin) were less active ; the MICs of these 4 drugs ranged from 6.25 to 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The remaining 9 drugs including benzylpenicillin and cloxacillin were inactive ; the MICs ranged from 100 to 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ or more.

2. β -lactamase-positive strains were 44 out of 88 (50%) of *Klebsiella* and 4 out of 101 (4.0%) of *E. coli*.