

牛の乳汁由来コアグララーゼ陰性ブドウ球菌の分類と薬剤感受性

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	小川, 美敬 遠藤, 俊夫
巻/号	41巻1号
掲載ページ	p. 40-44
発行年月	1988年1月

牛の乳汁由来コアグラールゼ陰性ブドウ球菌の分類と薬剤感受性

小川美敬* 遠藤俊夫*

(昭和 62 年 11 月 24 日受理)

Classification and Antibiotic-Sensitivity of Coagulase-Negative Staphylococci
Isolated from Cow's MilkYOSHITAKA OGAWA and TOSHIO ENDOU (Biological Research Laboratory,
Tanabe Seiyaku Co., Ltd., Toda, Saitama 335)

SUMMARY

Eighty-eight strains of coagulase-negative Staphylococci (CNS) were classified by the use of Api Staph (Asuka Junyaku Co., Ltd.). They consisted mainly of four species: *S. hyicus* (11.3%), *S. xyloso* (18.2%), *S. hominis* (20.5%) and *S. epidermidis* (15.9%). Of 67 CNS strains isolated from clotting cow's milk showing + or more in the modified CMT (PL test), *S. xyloso* (15 strains, 22.4%) was the most abundant. Ten antibiotics were examined for antibacterial activity against 391 strains of CNS isolated from cow's milk. Of them, cephalonium (CEL) exhibited the most potent activity (MIC₉₀: 0.08 μg/ml).

要 約

1) アピスタフを用いて牛乳汁由来コアグラールゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) 88 株を分類したところ、*S. hyicus* 10 株 (11.3%), *S. xyloso* 16 株 (18.2%), *S. hominis* 18 株 (20.5%) および *S. epidermidis* 14 株 (15.9%) の 4 菌種が全体の 65.9% を占めていた。

2) CMT 変法 (PL テスト) において凝集が + 以上を示した乳汁から分離された CNS 67 株についてみると、*S. xyloso* が 15 株 (22.4%) で他菌種と比べて多かった。

3) 乳汁由来 CNS 391 株に対するセフェム系、ペニシリン系、アミノグリコシド系、マクロライド系およびテトラサイクリン系 10 薬剤の *in vitro* 抗菌活性を MIC₉₀ により比較したところ、セフェム系のセファロニウム (CEL) が 0.08 μg/ml で最も優れていた。

牛乳房炎が乳量の減少あるいは乳質の低下をとおして、酪農経営に与える影響はきわめて大きい。酪農の近代化が進む我が国においても、乳房炎の発生はいぜんとして多く、多年にわたる防除対策にもかかわらず、減少の傾向は認められていない。また、従来、いわゆる非病原性と考えられ、乳房内の常在菌として軽視されてきたコアグラールゼ陰性ブドウ球菌 (CNS) が乳房炎の原因菌として見直され^{10,13)}、本菌の乳腺に対する病原性にはなお不明瞭な点が多いものの、乳房炎の重要な secondary pathogen と見なされるようになってきている^{8,11,12)}。今回われわれは、札幌周辺、帯広市内および千葉県下で乾乳直前に乳房炎と診断された乳房から採取した乳汁より分離した CNS の分類を試み、さらに、セファロニウムを含むセフェム系抗生物質および、現在、乳房炎に用いられている各種抗生物質に対する感受性を調べ、CNS の

菌種と薬剤感受性ならびに CMT 変法による乳汁の検査成績との関係を検討し、以下の成績を得た。

1. 材料および方法

1) 供試乳汁

1983 年 12 月から 1984 年 11 月までの間に札幌周辺、帯広市内および千葉県内の 3 地区の乳牛計 224 頭から乾乳直前に採取した乳汁を供試した。

2) CNS の分離と同定

乳汁 0.1 ml を 5% めん羊血液加ハートインフュージョン寒天平板 (栄研) あるいはトリプトソイ寒天平板 (栄研) 上に塗布し、37°C 48 時間培養した。材料採取中などにおきる汚染菌を排除するため、20 CFU/0.1 ml 以上の同じ性状を示す集落が発育した場合、それを乳汁あるいは乳房由来菌とし、COWAN & STEEL²⁾ の方法にしたがって属まで同定した。このうち、スタヒロコッカス属と同定された菌株は、さらにスタヒロコッカス 110 培地

* 田辺製薬株式会社生物研究所 (埼玉県戸田市川岸2-2-50)

(栄研) に 37℃ で 24 時間培養し、発育した菌株について PS コアグラゼ (栄研) によるコアグラゼ試験を行って CNS と同定した。このようにして得た 391 株の CNS から、牛の個体を考慮して 88 株を選び、アピスタフ (アスカ純薬) を用いて種の同定を行った。

3) CMT 変法による乳汁の検査

乳汁採取時に CMT 変法 [PL テスター (日本全薬)] による乳汁の検査を行い、凝集および色調の程度を観察した。

4) 薬剤感受性試験

セファロニウム (CEL), セファゾリンナトリウム (CEZ), ベンジルペニシリンカリウム (PCG), アンピシリンナトリウム (ABPC), クロキサシンナトリウム (MCIPC), ジクロキサシンナトリウム (MDIPC), 硫酸ストレプトマイシン (SM), 硫酸カナマイシン (KM), 酒石酸キタサマイシン (LM) および塩酸オキシテトラサイクリン (OTC) の 10 薬剤を供試薬剤とし、前培養に感受性測定用ブイヨン (ニッスイ), 感受性測定に感性ディスク用培地-N (ニッスイ) を用い、日本化学療法学会最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法⁹⁾ に準じて MIC を測定した。なお、供試株の 90% の発育を阻止するのに必要な濃度を MIC₉₀ として算出した。

2. 成 績

1) CNS の分類

表 1 に示すようにアピスタフを用いて乳汁由来 CNS 88 株の分類を試みたところ、75 株 (85.2%) が 9 種に分類された。その内訳は、*S. hyicus* 11.3%, *S. simulans* 5.7%, *S. xylosus* 18.2%, *S. saprophyticus* 1.1%, *S. haemolyticus* 3.4%, *S. warneri* 5.7%, *S. hominis* 20.5%, *S. epidermidis* 15.9%, *S. capitis* 3.4%, 同定不

表 1 乳汁由来 CNS 88 株の分類*

菌 種	計
<i>S. hyicus</i>	10 (11.3)**
<i>S. simulans</i>	5 (5.7)
<i>S. xylosus</i>	16 (18.2)
<i>S. saprophyticus</i>	1 (1.1)
<i>S. haemolyticus</i>	3 (3.4)
<i>S. warneri</i>	5 (5.7)
<i>S. hominis</i>	18 (20.5)
<i>S. epidermidis</i>	14 (15.9)
<i>S. capitis</i>	3 (3.4)
同定不能	13 (14.8)
計	88

注) *: アピスタフを用いた
**: 株数 (%)

能 14.8% で、*S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. hominis* および *S. epidermidis* の 4 菌種が全体の 65.9% を占めた。

2) CMT 変法における凝集と CNS の菌種

PL テストにおける凝集の程度と分類した 88 株の乳汁由来 CNS の菌種との関係を表 2 に示した。乳汁中細菌数が 200 CFU/ml 以上で、PL テストの凝集反応が + 以上を示し、潜在性乳房炎の可能性を疑う乳汁においては、*S. xylosus* が 67 株中 15 株 (22.4%) を占めた。

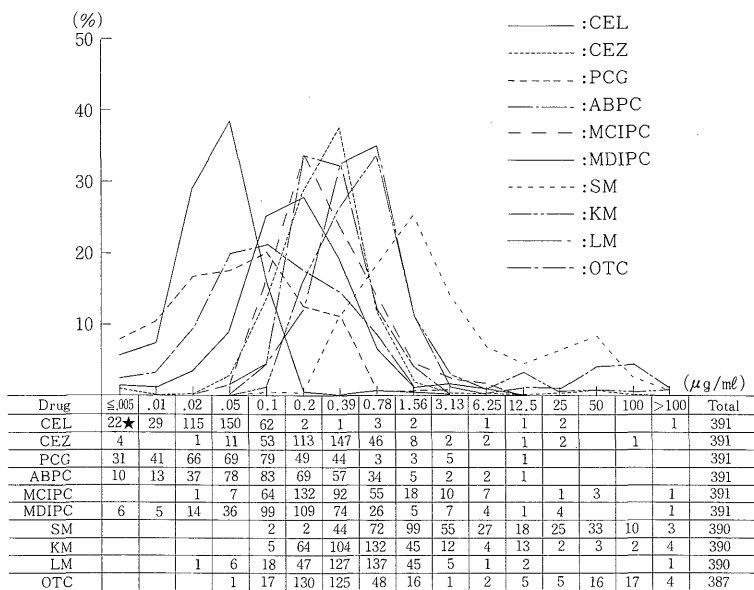
3) CNS 391 株の薬剤感受性

図 1 に示すように、CEL の MIC は 0.05 μg/ml にピークがあり、≤0.005~>100 μg/ml に分布し、CEZ は

表 2 乳汁の CMT 変法 (PL テスト) における凝集と分離された CNS の菌種との関係

菌 種	PL テストの凝集		計
	+以上	±以下	
<i>S. hyicus</i>	8*	2	10
<i>S. simulans</i>	5		5
<i>S. xylosus</i>	15	1	16
<i>S. saprophyticus</i>	1		1
<i>S. haemolyticus</i>	2	1	3
<i>S. warneri</i>	4	1	5
<i>S. hominis</i>	12	6	18
<i>S. epidermidis</i>	11	3	14
<i>S. capitis</i>	1	2	3
同定不能	8	5	13
計	67	21	88

注) *: 株数 (由来頭数に等しい)



注) ★: 株数

図 1 CNS 391 株の薬剤感受性分布

0.39 $\mu\text{g/ml}$ にピークがあり、 $\leq 0.005\sim 100\mu\text{g/ml}$ に分布し、それぞれ4株が12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した。PCGとABPCのMICはともに0.1 $\mu\text{g/ml}$ にピークがあり、 $\leq 0.005\sim 12.5\mu\text{g/ml}$ に分布した。MCIPCとMDIPCのMICは、0.2 $\mu\text{g/ml}$ ピークがあり、MCIPCは0.02 $\sim >100\mu\text{g/ml}$ に、MDIPCは $\leq 0.005\sim >100\mu\text{g/ml}$ に分布し、それぞれ5株および6株が12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した。SM, KM および OTC に対しては、それぞれ89株(22.8%)、24株(6.2%)および47株(12.1%)がMIC 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性であった。LMのMICは0.78 $\mu\text{g/ml}$ にピークがあり、0.02 \sim

$>100\mu\text{g/ml}$ に分布し、1株が100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性を示した。表3に示すように、MIC₉₀を比較するとCELが0.08 $\mu\text{g/ml}$ で他剤の0.27 $\sim 30.3\mu\text{g/ml}$ より低く、供試10薬剤のCNSに対する抗菌活性をMIC₉₀で比較するとCEL>PCG>ABPC>MDIPC>CEZ>MCIPC>LM>KM>OTC>SMの順に優れていた。

4) 菌種別CNSの薬剤感受性

9種に分類されたCNS 75株のうち、分離株数が10株以上であった*S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. hominis*および*S. epidermidis*に対する各種薬剤のMIC分布を表4に示した。これら4菌種において、CEL, CEZ, PCG, ABPC, MCIPC, MDIPCおよびLM耐性(MIC $\geq 12.5\mu\text{g/ml}$)は認められなかったが、*S. xylosus* 2株, *S. hyicus*, *S. hominis*, *S. epidermidis*各1株がSMに対して、*S. xylosus* 1株がKMに対して、*S. xylosus* 4株, *S. hominis* 1株がOTCに対して、それぞれMICが12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性であった。

S. simulans 5株, *S. saprophyticus* 1株, *S. haemolyticus* 3株, *S. warneri* 5株および*S. capitis* 3株の薬剤感受性は表に示さなかったが、*S. warneri* 1株がCEL, CEZ, PCG, MCIPCおよびMDIPCに対して、*S. simulans* 1株がMDIPCに対してそれぞれMICが12.5 $\mu\text{g/ml}$ 以上の耐性で、*S. haemolyticus*, *S. capitis*各1株および*S. warneri* 3株がSM耐性(MIC $\geq 12.5\mu\text{g/ml}$)であった。

表3 乳汁由来CNSに対する各種薬剤のMIC₉₀とMICの最大値および最小値

薬剤	株数	MIC ₉₀ ($\mu\text{g/ml}$)	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	
			最大値	最小値
CEL	391	0.08	>100	≤ 0.005
CEZ	391	0.59	100	≤ 0.005
PCG	391	0.27	12.5	≤ 0.005
ABPC	391	0.45	12.5	≤ 0.005
MCIPC	391	0.82	>100	0.02
MDIPC	391	0.52	>100	≤ 0.005
SM	390	30.30	>100	0.1
KM	390	1.69	>100	0.1
LM	390	1.04	>100	0.02
OTC	387	20.75	>100	0.05

表4 菌種別に分類したCNSの薬剤感受性分布

菌種	株数	薬剤	MIC ($\mu\text{g/ml}$)																
			≤ 0.005	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100	
<i>S. hyicus</i>	10	CEL	2*		1	7													
		CEZ				1	1	7	1										
		PCG	2	1	4		2			1									
		ABPC		1		4	2	1	2										
		MCIPC			1			6	3										
		MDIPC		1			3	4	2										
		SM									1	5	2	1			1		
		KM									7	3							
		LM									3	6	1						
		OTC					2	4	3	1									
<i>S. xylosus</i>	16	CEL	2	1	6	5	2												
		CEZ					1	2	8	4	1								
		PCG			1	10	5												
		ABPC				2	8	4	2										
		MCIPC					1	4	5	5		1							
		MDIPC				1		6	7	2									
		SM							2	7	1	2	2		1		1		
		KM						2	7	4	1	1				1			
		LM							2	7	7								
		OTC					2	4	5	1						1	2	1	

菌種	株数	薬剤	MIC (μg/ml)															
			≤0.005	0.01	0.02	0.05	0.1	0.2	0.39	0.78	1.96	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
<i>S. hominis</i>	18	CEL			3	9	6											
		CEZ				1	2	4	9	2								
		PCG		1	2	1	5	3	6									
		ABPC			1	2	1	3	7	4								
		MCIPC					3	12	3									
		MDIPC				2	7	6	3									
		SM						1	10	2	2	2					1	
		KM							10	3	3	2						
		LM						1	1	13	3							
		OTC						1	8	4	3	1					1	
<i>S. epidermidis</i>	14	CEL	2	3	3	4	2											
		CEZ	1		1	1	2	6	1	1	1							
		PCG	5		3	1	3	2										
		ABPC	2	2		3	2	4	1									
		MCIPC				1	5	5	2	1								
		MDIPC	1		2	2	3	5	1									
		SM							1	3	5	4			1			
		KM						1	6	5	2							
		LM					1	6	2	3	2							
		OTC					3	6		4	1							

注) *: 株数

3. 考 察

CNSは最近潜在性乳房炎の起因菌として注目され、分類も複雑になってきている^{1,4,6)}。今回、牛乳房炎乳汁由来391株よりCNS 88株を選び、アピスタフを用いて分類した。この同定操作において、melibiose分解能およびN-acetylglucosamineの判定がややむずかしいものの、75株(85.2%)が同定され、黒坂ら⁷⁾によるアピスタフを用いたヒト臨床材料から分離したCNSの同定率82%とよく一致した。CNS 88株の菌種別構成は、*S. hyicus* 11.3%、*S. xyloso* 18.2%、*S. hominis* 20.5%、*S. epidermidis* 15.9%など9菌種で、これら4菌種が多数(65.9%)を占めた。SINCOWEAY¹²⁾らは牛乳汁由来CNSの内、増殖性が強く溶血毒あるいは酵素類を産生する株が多い菌種として、*S. simulans*、*S. warneri*、*S. xyloso*および*S. epidermidis*を注目し、その分離率はそれぞれ11%、19.4%、17.4%および12.9%と報告している。今回供試したCNS 88株の同定結果と比較すると、その分離頻度は*S. xyloso*および*S. epidermidis*でよく一致したが、*S. simulans*および*S. warneri*はわれわれの検査では5.7%と低かった。また、SINCOWEAYらの報告¹¹⁾では分離されず、DEVRIESEら³⁾が1987年に家畜・家禽由来のブドウ球菌を分類し、新しい菌種として報告した*S. hyicus*が今回10株(11.3%)分類された。

CNS 88株の内、PLテストにおいて凝集が+以上で細胞数が1 ml中50万個以上と推定された67頭の乳汁

から分離された67株では、*S. xyloso*が15株(22.4%)と比較的多く、*S. xyloso*の乳房炎への関与が強く示唆された。今回の分類に用いたアピスタフでブドウ球菌として13菌種(CNSとして12菌種)の同定が可能である。今回の調査では、このCNS 12菌種のうち9菌種が乳房炎乳汁より分離された。しかし、今回の分類結果から、CNSの内、どの菌種が乳房炎に強く関与しているか特定することは難しく、さらに多くの菌株を供試して菌種の分類を試みる必要があると思われた。

今回供試した、CEL、CEZ、PCG、ABPC、MCIPC、MDIPC、SM、KM、LMおよびOTCの乳汁由来CNS 391株に対するMIC₉₀は、CELが0.08μg/mlで供試10薬剤中最も高い抗菌活性を示した。CELは牛乳汁中で分解せず、ペニシリナーゼに対しても安定⁵⁾であり、CNSは潜在性乳房炎の起因菌として注目されていることから、本剤は牛乳房炎用薬剤として極めて有用であると思われた。CNS 391株中でアピスタフによる同定を試みた88株の内、菌種まで同定された75株の供試10薬剤に対する薬剤感受性パターンは、菌種までの同定を試みなかった株を含む391株のそれとよく類似しており、CNSの薬剤感受性に種特異的な傾向はないものと考えられた。

引用文献

- 1) BROWN, R. W.: *Cornell Vet.*, 73, 109~116 (1983).
- 2) COWAN, S. T.: *Cowan and Steel's Manual for the identification of medical bacteria*, 2nd ed., Cambridge University Press, 48~50 (1974).

- 3) DEVRIESE, L. A., H'AJEK, V., OEDING, P., et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28, 482~490 (1978).
- 4) DEVRIESE, L. A., SCHLEIFER, K. H., ADEGOKE, G. O.: *J. Appl. Bacteriol.*, 58, 45~55 (1985).
- 5) 遠藤俊夫, 松下忠弘, 芝田和夫, ほか: 獣医畜産新報, 767, 10~14 (1985).
- 6) KLOOS, W. E. and SCHLEIFER K. H.: *J. Clin. Microbiol.* 1, 82~88 (1975).
- 7) 黒坂公生, 保科定頼: モダンメディア, 28(11) 19~31 (1982).
- 8) 黒坂公生: 化学療法の領域, 1(1) 96~100 (1985).
- 9) 日本化学療法学会 MIC 測定法改訂委員会: *Chemotherapy*, 29, 76~79 (1981).
- 10) SINCOWEAY, H., 宮地龍彦, 柏崎 守, ほか: 日本獣医畜産大学研究報告, 29, 58~62 (1980).
- 11) SINCOWEAY H., 久米常夫: *Bull. Natl. Inst. Anim. Health*, 81, 8~14 (1981).
- 12) SINCOWEAY H., 久米常夫: *Ibid.*, 15~19 (1981).
- 13) 新城敏晴, 宮崎千鶴, 浜名克己, ほか: 宮崎大学農学部研究報告, 27, 397~402 (1980).

深層部浸透!

特長

持続性のあるおだやかな発泡力でクリーンUPL治療を速めます。

要指

泌乳期用

乾乳期用

ホーミング®DX 乾乳用ホーミング®DC

ジクロキサリン製剤 20ml ←新発売→ マイシリン製剤 20ml (供給 全農)

- マイシリン泌乳期用……………ホーミングMC (20ml) ミリンジタイプ
- 子宮内膜炎用治療剤……………子宮内膜炎用ホーミングマイシン (60ml)



Riken 理研畜産化薬株式会社

埼玉県川口市元郷4-1-8
〒332 TEL (0482)24-8451(代)
FAX (0482)24-1079

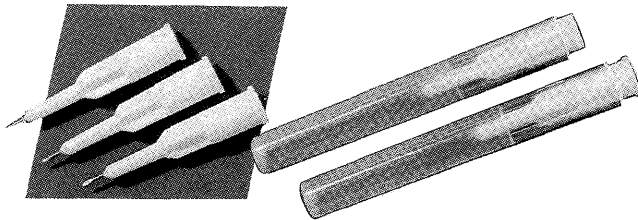
NEW

畜産現場の要求に答えて……

TB針ディスプレイザブル

承認番号62畜A3853

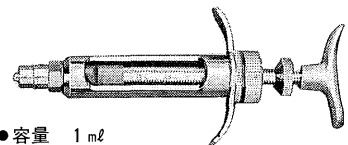
衛生的で使いやすく確実なツベルクリン用皮内注射針



- ディスポーザブル
- E, O, G 滅菌済
- 1基 ● 1グロス入

▲ 針の着脱はこのキャップに
よって安全に確実にできます

注射器はマイエル1を
御使用ください



- 容量 1ml
- 針基 1先

FHK 富士平工業株式会社

東京都文京区本郷6丁目11番6号 〒113
電話 東京(03)812-2271 ファクシミリ(03)812-3663