

○大澤綾、木内英昭、小松浩
飯田家畜保健衛生所

要約

近年難治性乳房炎の要因の1つとしてバイオフィーム（BF）が注目されている。BFは物質の表面に付着した微生物集団と微生物によって産生される細胞外マトリクス成分（EPS：Extracellular polymeric substances）によって構成される複合体を言う。そこで管内酪農家のバルク乳由来黄色ブドウ球菌（SA）のBF形成能、搾乳機器の洗浄・殺菌への影響および薬剤感受性を調査した。BF形成能の検出には変法コンゴレッド寒天培地を用い、黒色コロニーを形成したものをBF形成株とした。供試した59株のSAにおいて全株がBF形成SA（BFSA）だった。これらのBFSAは最小濃度の搾乳機器用洗浄剤には4株中3株、殺菌剤には5分以上の感作で全株が感受性を示した。また、各種薬剤の最小殺菌濃度（MBC）は高値（ $>1,024 \mu\text{g/ml}$ ）を示した。今回の調査から、BFSAはバルク乳における存在率は高いものの、一般的な衛生管理の徹底により搾乳機器からの排除は可能と考えられた。一方BFSAによる牛乳房炎は、薬剤治療がより困難なことが示唆された。以上の成績はより効果的な搾乳衛生指導の一助として有意義と考えられた。

1 はじめに

乳房炎原因菌の1つとして長年にわたり様々な対策が講じられてきた黄色ブドウ球菌（SA）は現在も乳質等への影響が大きい細菌として認知されている。一般的にSAによる乳房炎は治癒率が低く、伝染性のため牛群中の慢性乳房炎牛増加を招く要因の1つとされている [10]。

治癒率が低い要因の1つとして、注目されているのが近年SAのバイオフィーム（BF）である [1,4]。BFは物質の表面に付着した微生物集団と微生物によって産生される細胞外マトリクス成分（EPS：Extracellular polymeric substances）によって構成される複合体であり、図1のような形成過程を辿る [2]。

また、管内酪農家全戸を対象としたバルク乳細菌検査におけるSA分離戸数を2015～2020年度の5年間で比較したところ、2017年度以降増加傾向を示している（図2）。

今回より効果的な搾乳衛生指導の一助とするため、管内酪農家のバルク乳由来SAのBF形成能、搾乳機器の洗浄・殺菌への影響

及び薬剤感受性を調査した。

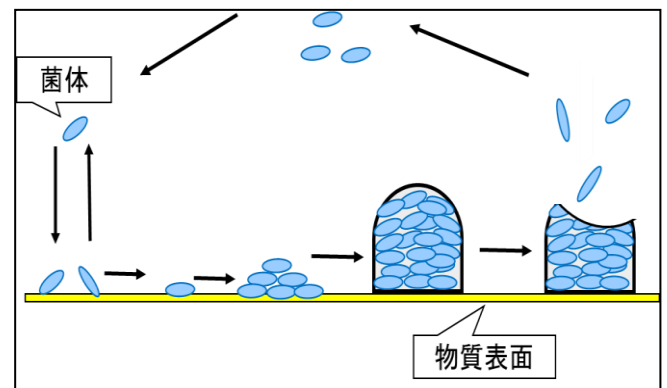


図1 BF形成過程

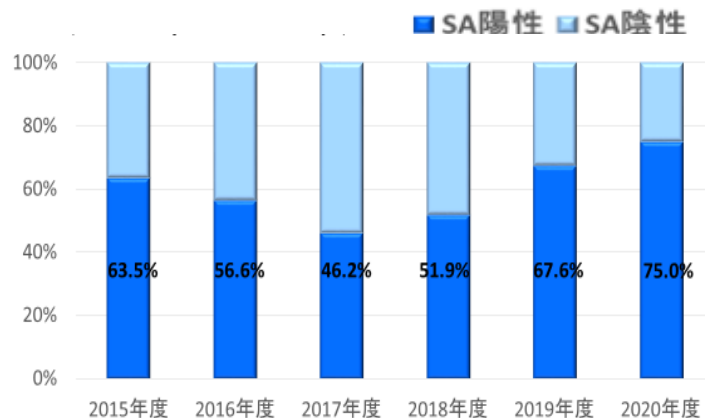


図2 バルク乳中のSA分離農家戸数の推移

2 バルク乳由来 SA の BF 形成能調査

(1) 材料および方法

2014 年度に分離した 23 株および 2020 年度に分離した 36 株、計 59 株のバルク乳由来 SA を材料とした (表 1)。

方法は変法コンゴレッドアガー法

(MCRA 法) を用いた [5]。MCRA の組成は表 2 に示した。MCRA 法は直接 BF 形成を検出するものではなく、細菌の BF 形成に関わる EPS 主要成分の 1 つである細胞外多糖の有無を判定する。

MCRA に SA を塗抹し、37℃、48 時間、好気条件下で培養後、黒色コロニーを形成したものを陽性、それ以外の色のコロニーを陰性 (図 3) とした。

表 1 供試菌株内訳

分離年度	菌株数	農場数
2014 年	23	23
2020 年	36	21
計	59	44

表 2 MCRA 組成

成分	
コンゴレッド色素	0.4g
グルコース	10g
BAB-2 [※]	40g
精製水	1L

※ : Blood Base Ager-2

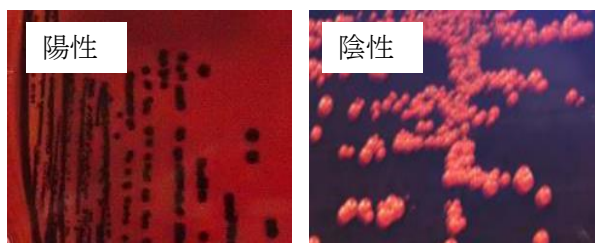


図 3 MCRA 陽性・陰性コロニー

(2) 結果

調査した SA 全株が、細胞外多糖を有していた (表 3)。

表 3 細胞外多糖形成能

分離年度	有	無
2014 年	23	0
2020 年	36	0
計	59	0

3 BF 形成株に対する消毒薬等の影響

(1) 材料および方法

SA 6 株 (BF 陽性コントロール : ATCC29213、MCRA 陽性株 : 5 株) を用いて、搾乳機器洗浄剤および殺菌剤への感受性試験を実施した (表 4)。

ミューラーヒントン寒天培地 (MHA) で 37℃、24 時間好気培養した SA をミューラーヒントン液体培地 (MHB) により $2 \sim 5 \times 10^7$ CFU/ml に濃度調整後、H.CERI らの方法 [6,9] を用いてペグへ BF を形成させた。

搾乳機器洗浄剤感受性試験では使用規定濃度 (0.5%) に調整し、60℃に保温したアルカリ性洗浄剤に 45℃、7 分間感作後、滅菌蒸留水で 3 回洗浄、使用規定濃度 (0.1%) に調整した酸性リンス剤に 37℃、1 分間感作させ、滅菌蒸留水で 3 回洗浄後、MHB により 37℃、24 時間回復培養を行った (図 4)。

搾乳機器殺菌剤感受性試験においても洗浄剤と同様の方法でペグへ BF を形成させた後、使用規定濃度である 300 倍およびその 2 分の 1 の濃度である 600 倍に希釈した殺菌剤に 1 分、5 分および 10 分間、室温

(22.3℃) で各々感作させた後、滅菌蒸留水で 3 回洗浄後、MHB により 37℃、24 時間回復培養を行った。

ペグに付着した SA の生存については微生物検出キット Microbial Viability Assay Kit-WST (株同仁化学研究所) を使用して判定した (図 5) [8]。

表4 感受性試験供試 SA 一覧

分離年度	菌株 No.	MCRA	由来
	ATCC29213	陽性	
2014	1561	陽性	バルク乳
2014	1579	陽性	バルク乳
2020	11	陽性	バルク乳
2020	18	陽性	バルク乳
2020	25	陽性	バルク乳

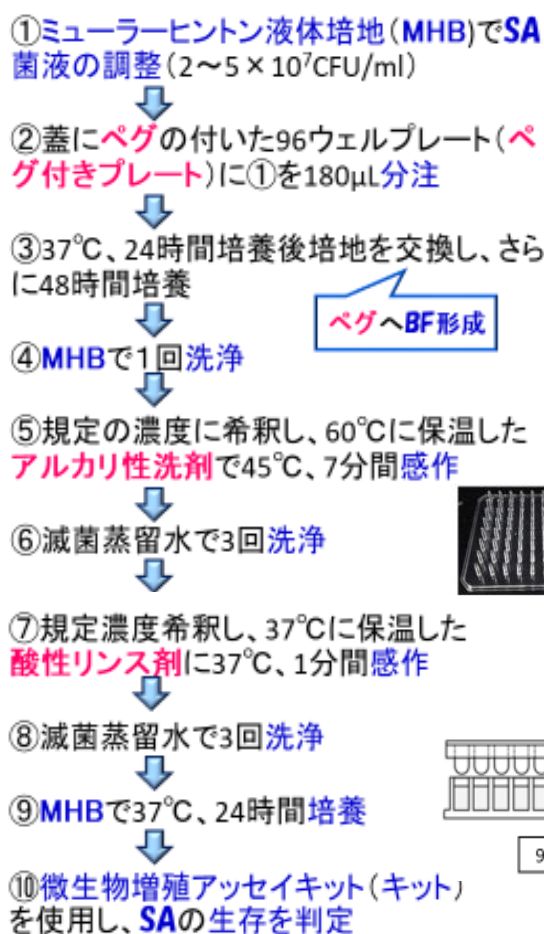


図4 洗浄剤感受性試験フローチャート

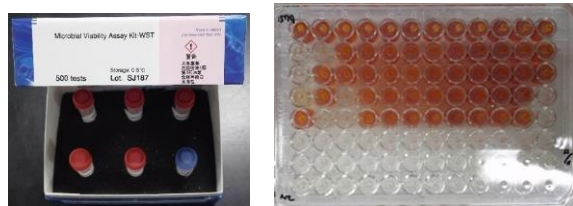


図5 微生物検出キット
Microbial Viability Assay Kit-WST

(2) 結果

洗浄剤は6株全てで感受性が確認された(表5)。

殺菌剤は規定濃度(300倍希釈)の場合、どの感作時間においても感受性であった。しかし、規定の1/2濃度(600倍希釈)の場合、1分間の感作で6株中2株が耐性を示した(表6)。

表5 洗浄剤感受性試験結果

	ATCC 29213	1561	1579	11	18	25
アルカリ性洗剤 + 酸性リンス剤	+	+	+	+	+	+

+ : 感性

表6 殺菌剤感受性試験結果

希釈倍率	感作時間(分)	ATCC 29213	1561	1579	11	18	25
300倍	1	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+
600倍	1	-	+	+	+	+	-
	5	+	+	+	+	+	±
	10	+	+	+	+	+	+

+ : 感性 ± : 中間 - : 耐性

4 BF形成と薬剤感受性の変化

(1) 材料および方法

「3 BF形成株に対する消毒薬等の影響」試験と同様のSA 6株(BF陽性性コントロール: ATCC29213、MCRA陽性株: 5株)を用いて、BFを形成していない状態(BF(-))およびBFを形成した状態(BF(+))で5薬剤(ABPC、OTC、SM、KM、ERFX)に対する最小殺菌濃度(minimal bactericidal concentration: MBC)を測定した。BFの形成については「3 BF形成株に対する消毒薬等の影響」

試験と同様に H.CERI らの方法を用いてペグへ BF を形成させた。薬剤感受性試験は CLSI (Clinical and Laboratory Standards for Institute) の微量液体希釈法により実施した。薬剤は 2 倍階段希釈により 1,024 μ g/ml \sim 1 μ g/ml まで濃度調整を行った。

BF(-)の SA 生存の有無については薬剤に感作させた後の培養液を MHB で 10 倍に希釈後、MHA に接種し 37 $^{\circ}$ C、24 時間好気条件下で培養し、コロニーの有無を確認した。

BF(+)の SA 生存の有無については「3 BF 形成株に対する消毒薬等の影響」試験と同様に微生物検出キット Microbial Viability Assay Kit-WST (榎同仁化学研究所) により判定した。

薬剤感受性試験の方法を図 6 および 7 に示した。

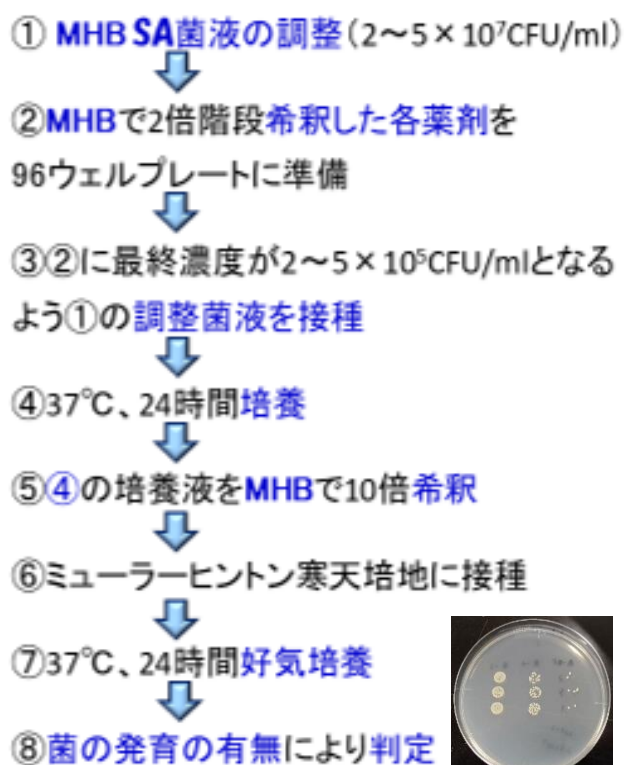


図 6 BF (-) の薬剤感受性試験フローチャート

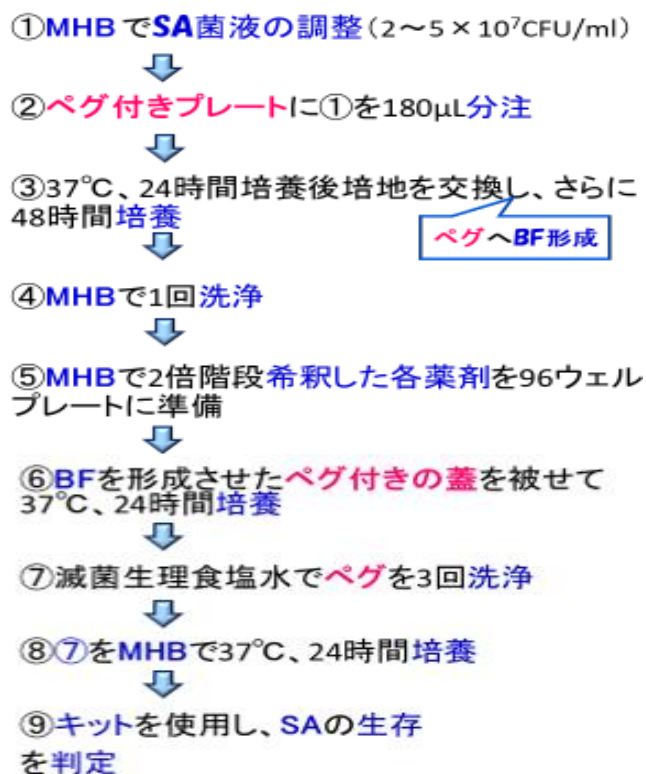


図 7 BF (+) の薬剤感受性試験フローチャート

(2) 結果

全株がどの薬剤においても BF(-)と比べ BF(+)の MBC で高値を示した(表 7、8)。

表 7 BF (-) MBC 結果一覧

菌株/ 薬剤	ATCC 29213	1561	1579	11	18	25
ABPC	32	256	8	8	8	8
OTC	512	256	8	256	512	64
SM	16	64	16	64	64	32
KM	16	64	8	32	32	16
ERFX	<1	<1	<1	<1	<1	<1

(μ g/ml)

表 8 BF (+) MBC 結果一覧

菌株/ 薬剤	ATCC 29213	1561	1579	11	18	25
ABPC	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024	>1,024
OTC	>1,024	512	256	>1,024	1,024	>1,024
SM	1,024	512	256	>1,024	1,024	>1,024
KM	32	512	>1,024	>1,024	1,024	>1,024
ERFX	256	512	256	>1,024	1,024	>1,024

(μ g/ml)

5 考察

バルク乳由来 SA の BF 形成能調査では供試菌 59 株全てで BF の主要構成成分の 1 つである細胞外多糖形成能陽性となり、バルク乳由来 SA の BF 形成能保有率は高い可能性が示唆された。

搾乳機器洗浄剤および殺菌剤効果における試験では規定の濃度・手順の場合、BF 形成による洗浄・殺菌への影響はないことが示され、正しい手順と薬剤濃度により BF を形成した状態の SA も排除可能と考えられる。

また、薬剤感受性試験では BF 形成状態での MBC は BF を形成していない場合と比較し、高い濃度を示していたことから、SA による乳房炎の難治性に BF 形成の関与が示唆された。

しかし、今回行った試験はいずれも Christense らの開発した BF 形成の定量的検査方法 [6] のように直接的な BF 形成の有無および BF 形成時の菌の定量による確認が必要と思われる。

今回の調査からバルク乳由来の SA は BF 形成能保有率が高い可能性があるものの、

- ①搾乳機器の水洗による有機物の除去
- ②規定濃度・反応時間・温度を守った洗浄
- ③殺菌剤の使用

といった搾乳機器の洗浄・消毒の徹底により搾乳環境中の BF 形成 SA の残存を抑制することで農場内での新たな SA 感染牛の増加抑制につながると考えられる。

また、バルク乳由来 SA の BF 形成による薬剤感受性の低下が示され、動物医療分野における BF 形成細菌感染症に対するメカニズムの解明と効果的治療法確立に繋がることを期待する。

(参考文献)

- [1] 山下祐輔、小千田圭吾、酒詰史子、山中俊嗣、牧野康太郎、中田理美、下平敏之、丹倫枝、小林玲欧那、吉田隆、角田浩. 臨床型乳房炎由来菌のバイオフィーム形成能と病原性 家畜感染症学会誌 5 巻 4 号 121-131 (2016)
- [2] 稲葉知大、清川達則、尾花望、豊福雅典、八幡穰、野村暢彦. 集団微生物学のすすめ バイオフィームとその解析技術 化学と生物 Vol.52, No.9.(2014)
- [3] Dunne, W. M. 2002. Bacterial Adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *Clinical Microbiology Reviews*. 15(2):155-166.
- [4] Fox, L. K., Zadoks, R. N. and Gaskins, C.T. 2005. Biofilm production by *Staphylococcus aureus* associated with intramammary infection. *Vet. Microbiol.* 107:295-299.
- [5] N.S.Mrianara, S.A.Salman, V.Neela and S.Zamberi.2009. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin-resistance *Staphylococcus aureus* *African Journal of Microbiology Research* Vol.3(6)pp.330-338
- [6] H. CERI, M. E. OLSON, C. STREMIK, R. R. READ, D. MORCK, AND A. BURET. 1999. The Calgary Biofilm Device: New Technology for Rapid Determination of Antibiotic Susceptibilities of Bacterial Biofilms. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, p. 1771-1776
- [7] 塚谷忠之. 水溶性テトラリゾリウム塩 WST を用いた微生物検出方法の開発と食品分野への応用 *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku*,62(7),321-327(2015)
- [8] Christensen, G. D., Simpson, W. A., Bisno, A. L. and Beachey, E. H. 1982. Adherence of Slime-Producing Strains of *Staphylococcus epidermidis* to Smooth Surfaces. *Infect. Immun.* 37(1):318-326.

[9] Kaoru YAMABE, Ykiko ARAKAWA, Masaki SHOJI, Mitsuko ONDA, Katsushiro MIYAMOTO, Takahiro TSUCHIYA, Yukihiro AKEDA, Kuniko TERADA, and Kazuniori TOMONO. 2020 Direct anti-biofilm effects of macrolides on *Actinobacter baumannii*: comprehensive and comparative demonstration by a simple assay using microtiter plate combined with peg-lid. *Biomedical Research(Tokyo)*41(6)259-268

[1 0] 三好志朗、三浦道三郎.
最新 乳房炎コントロール 損失を最小限にする (株) デーリィ・ジャパン社 2017