

15 *Campylobacter fetus* 亜種 *fetus* 感染牛に対する投薬効果

十勝家畜保健衛生所

○加藤 千絵子 吉田 美葉
伊藤 満

はじめに

Campylobacter fetus (Cf) はグラム陰性らせん状の桿菌で、牛カンピロバクター症の原因となる。本病は流産や低受胎を主症状とし、種畜衛生検査の対象疾病となっている。一方で種雄牛は感染しても無症状であり、雌では繁殖障害以外の特徴的な症状は認められない。Cfは亜種 *venerealis* (Cfv)、亜種 *fetus* (Cff) 及び亜種 *testudinum* の3亜種に分類され、そのうちCfv及びCffが牛カンピロバクター症の原因となる。それぞれ主な定着部位は異なり、Cfvは牛の生殖器に、Cffは牛の腸管に定着する[1]。また、分離状況も異なり、Cfvは2002年以降国内における分離報告は確認されていないが、Cffは子牛の26%が腸管内に保菌[2]しているという報告もあり、十勝管内でも種畜衛生検査で毎年1~2例の分離事例がある(図1)。

本病の発生時の対応について、家畜防疫対策要綱(要綱)には亜種の区別はなく「本病と診断された種雄牛は(略)治療等必要な防疫措置を講じ」と記載があるが、本病に対する確立された治療法は示されていない。現在、当所では昭和50年の要綱記載の治療例を参考としているが、Cfvを対象としていると考えられる生殖器からの菌の排除を主目的とした治療例であり、Cffの主な定着部位である腸管からの排除効果は明確ではない。そこで本調査では、要綱を参考にCffの腸管感染牛へ投薬を行い、糞便内のCffの消長及び薬剤耐性獲得への影響を検証した。

I 方法

1 検体

管内の1農場において飼養されている36頭の牛の糞便を試験に供した。調査期間は令和2年6月から8月。供試牛は採材時9カ月~5歳齢で、臨床的な異常はなかった。

2 Cffの分離培養

Cffの分離は、牛糞便1gをナリジク

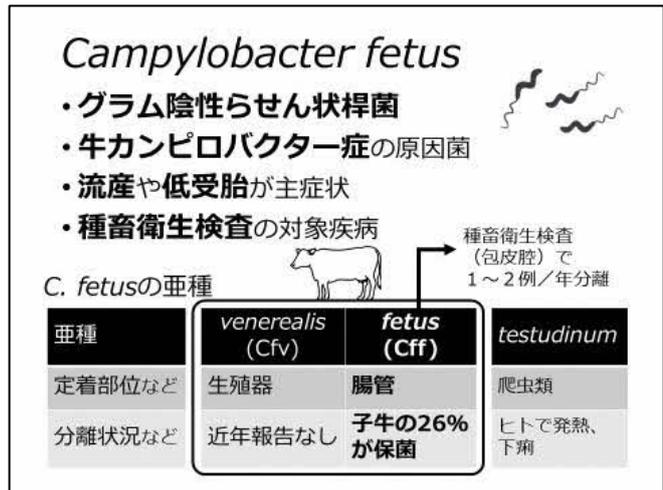


図1 Cfの概要

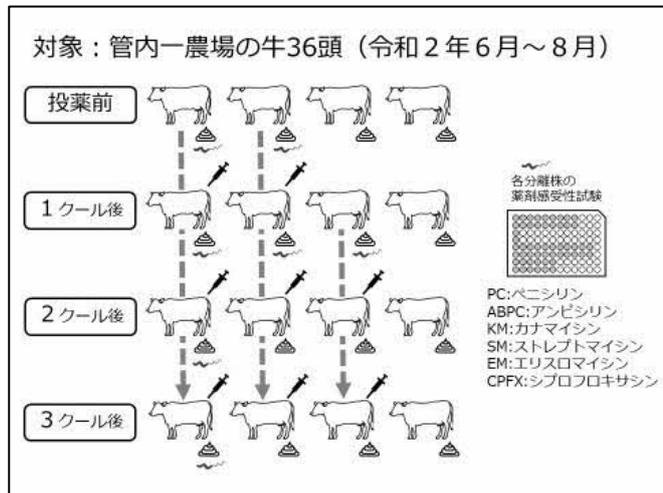


図2 Cffの分離及び薬剤感受性試験

ス酸添加 (5mg/l) プレストン増菌培地 9ml に入れて微好気条件で 30℃、2 日間培養後、ナリジクス酸添加 (5mg/l) mCCDA 培地に画線塗抹し、微好気条件で 30℃、3 日間培養、Cff を疑うコロニーを mCCDA 培地に塗抹し、微好気条件で 37℃、2 日間培養後、Cf 亜種特異的 PCR[3] で Cff と同定した。

3 Cff の薬剤感受性試験

糞便 1 検体あたり 2 株の Cff について微量液体希釈法で薬剤感受性試験を実施した。供試菌株は、血液未添加ミューラーヒントンプロス (MHB) を用いて微好気条件で 37℃、48 時間培養し、その後 MHB で McFarland 標準濁度液 1 の濁度に調整し、接種用菌液とした。薬剤の最小発育阻止濃度 (MIC) は CLSI のガイドラインに準拠して測定した。薬剤は、ペニシリン (PC)、アンピシリン (ABPC)、カナマイシン (KM)、ストレプトマイシン (SM)、エリスロマイシン (EM) 及びシプロフロキサシン (CPF) を選定した。培養は、微好気条件で 37℃、48 時間培養した (図 2)。

4 投薬スケジュール

上記 2 の Cff 分離培養で陽性となった牛について要綱を参考に投薬を 3 クール実施した。投薬は 1 頭当たり ABPC8g (1 歳齢未満は 4g) を 5 日間投薬 (筋肉内注射)、9 日間休薬の計 14 日間を 1 クールとした (図 3)。調査期間中に陰転した場合も 3 クール目まで投薬を継続した。また、初回の分離培養で陰性であって 2 回目 (初回陽性牛の 1 クール後) で陽性となった場合はその時点から投薬を開始した。ただし、初回陽性牛の 3 クール終了に併せて投薬を 2 クールで終了した。

各クール後に陰性牛を含む全頭の糞便を採取し Cff の分離培養及び薬剤感受性試験を実施した。

5 大腸菌の分離培養及び薬剤感受性試験

投薬による常在細菌の薬剤耐性獲得への影響を調べる目的で、投薬個体の糞便から指標菌として大腸菌を分離し、薬剤感受性試験を実施した。試験には、投薬を行った個体の投薬前及び 3 クール後 (3 クールまで投薬を行っていない個体においては 2 クール後) の糞便を供した。大腸菌は、DHL 寒天培地に糞便を塗抹し、37℃で一晩培養し、糞便 1 検体あたり 5~6 株分離した。これらの分離株について、1 濃度ディスク拡散法で薬剤感受性試験を実施した。薬剤は、ABPC、セファゾリン (CEZ)、シフロキサシン (CFX)、セフォタキシム (CTX)、KM、SM、ゲンタマイシン (GM)、テトラサイクリン (TC)、クロラムフェニコール (CP)、ST 合剤 (SXT)、ナリジクス酸 (NA) 及び CPF) を選定した (図 4)。

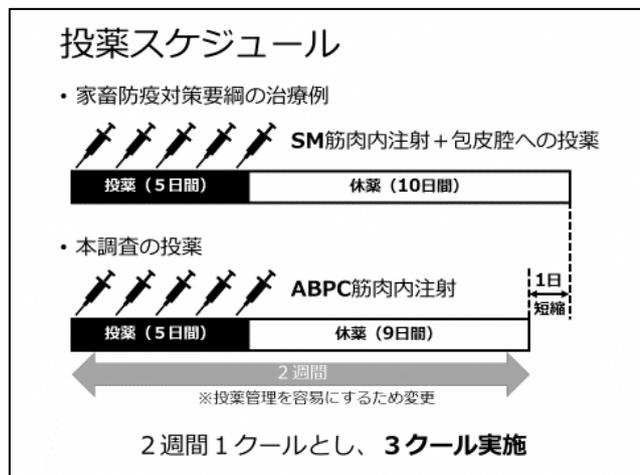


図 3 投薬スケジュール

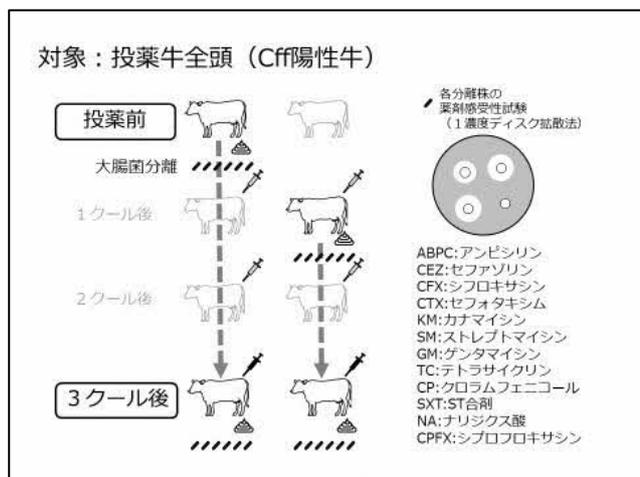


図 4 大腸菌の分離及び薬剤感受性試験

II 結果

1 Cff の分離培養

供試牛 36 頭のうち調査期間中に 8 頭の牛から Cff が分離され (表 1)、34 株の菌株を収集した。1 クール後に 3 頭が陰転、2 クール後に 4 頭が陰転、3 クール後に 1 頭が陰転した。ただし、1 クール後に陰転した個体のうち 2 頭は再度陽性となった。ほか 28 頭は調査期間中に Cff は分離されなかった。

表 1 Cff 陽性牛の投薬前後の分離結果

個体	投薬前	1クール後	2クール後	3クール後	
1	+	-	-	-	1クールで陰転
2	+	+	-	-	2クールで陰転
3	+	+	-	-	
4	+	+	-	-	
5*	+	+	-	-	3クールで陰転
6	+	+	+	-	
7	+	-	-	+	1クールで陰転後、陽転
8	+	-	+	+	

+ : Cff 分離陽性 - : Cff 分離陰性 *初回陰性、2 回目陽性

2 Cff の薬剤感受性試験

Cff 分離株の薬剤感受性試験結果を表 2 に示した。同一検体由来の 2 株は 1 検体を除き各薬剤に対してほぼ同様の薬剤感受性を示した。KM、SM 及び CPFX に対する耐性株は複数確認された。PC 及び ABPC については、治療前の分離株と比較して 1 クール後の分離株で MIC が高い傾向にあったが、明確な耐性株は調査期間を通じて認められなかった。

さらに、CPFX における感受性試験結果の経時的変化を表 3 に示した。CPFX 耐性株 (MIC:32 μ g/ml) は、治療前には分離株の多くを占めたが、投薬クール毎に分離株数が減少し、3 クール後には消失した。

表 2 Cff 分離株の薬剤感受性試験結果 (各 MIC における株数)

MIC(μ g/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
PC	0	0	0	0	2	27	5	0	0	0	0
ABPC	0	0	0	2	19	5	8	0	0	0	0
KM	0	0	0	0	0	18	12	0	0	0	4
SM	0	0	9	10	3	1	0	0	0	0	11
EM*	0	24	8	0	0	0	0	0	0	0	0
CPFX	5	0	0	0	0	5	0	24	0	0	0

*分離株のうち 2 株は未実施

表 3 Cff 分離株の CPFX 感受性の経時的変化 (各 MIC における株数)

MIC(μ g/ml)	0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	>128
治療前	2	0	0	0	0	2	0	12	0	0	0
1クール後	0	0	0	0	0	0	0	10	0	0	0
2クール後	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
3クール後	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0

3 大腸菌の分離及び薬剤感受性試験結果

投薬前の糞便から 61 株、3クール後の糞便から 62 株の大腸菌を収集した。大腸菌の投薬前及び投薬後の薬剤感受性試験結果を図 5 に示した。また、ABPC 及び CEZ の薬剤感受性試験結果の分布を表 4 に示した。投薬に使用した ABPC について、投薬前及び 3 クール後で耐性率の上昇は確認されなかった。

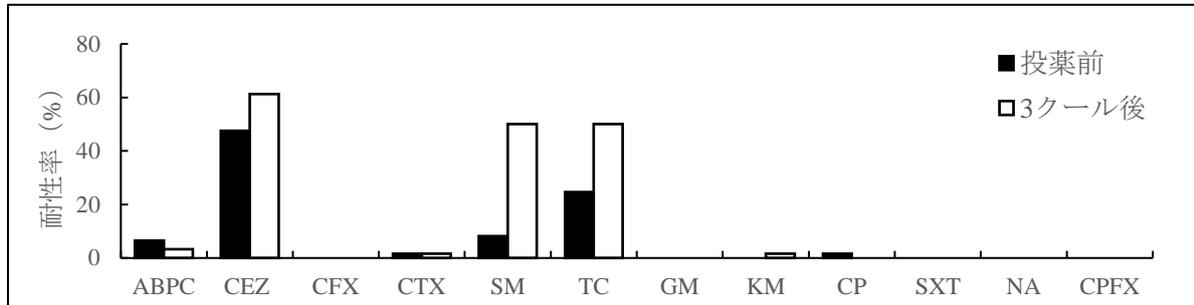


図 5 大腸菌の薬剤感受性試験

表 4 大腸菌の薬剤感受性試験 (ABPC 及び CEZ)

阻止円(mm)	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	耐性	中間	感性	耐性率
ABPC	投薬前	0	0	4	8	10	8	11	8	8	3	1	0	13	14-16	17	6.6%
	3クール後	0	0	2	7	9	13	12	13	5	1	0	0				3.2%
CEZ	投薬前	1	0	0	0	0	0	0	8	20	23	8	0	19	20-22	23	47.5%
	3クール後	0	0	0	0	1	0	2	9	26	20	4	0				61.3%

III 考察

今回、Cff の腸管感染牛に対し、要綱を参考として投薬を実施し、Cff の消長及び薬剤耐性獲得への影響を調査した。要綱記載の治療例では、SM の筋肉内注射及び包皮腔内への投薬等を 5 日間実施後、休薬 10 日間の計 15 日間で 1 クールとし、それを 3 クール実施することとしている。本調査では Cff 分離株の約半数は SM を含む複数の薬剤に明確な耐性を示した。一方、投薬前の薬剤感受性試験において分離株は全て ABPC に感受性を示したため投薬には ABPC を選択した。また、投薬の管理を容易とするため、休薬を 1 日短縮した計 14 日間で 1 クールとし、これを 3 クール実施した。

今回供試した牛における腸管内 Cff 保菌率は 22.2% (8 頭/36 頭) であり、健康牛から一定の割合で Cff が分離されるという報告 [2, 4] を支持した。陽性牛 8 頭のうち 6 頭は 3 クールないし 2 クールの投薬によって陰性となった。このことは、腸管からの Cff の排除における本投薬スケジュールの有効性を示唆している。一方、陰転した後に再度陽性となり、3 クール後も Cff が分離される個体が 2 頭いた。これらの分離株は陰転前及び陽転後で薬剤感受性パターンが同一であった。このことから、陰転後の陽転は当初の菌株が排除された後に新たな菌株が感染したものでなく、一時的な菌量の低下による未検出に起因するものと考えた。今後、陰転前及び陽転後の分離菌の相同性解析のため、PFGE を実施する予定である。

Cff の薬剤感受性試験結果については、調査期間を通じて分離株は全て ABPC 感受性であった。このことは本投薬スケジュールによる Cff の薬剤耐性獲得への影響が少ないことを示唆している。カンピロバクター属菌は家畜へのキノロン使用に伴い、家畜からの耐性株の分離率が急速に上昇しているとされる [5]。本調査では CPFIX 耐性株は投薬前には多く分離されたが、1 クール毎にその分離数は減少し、3 クール後には消失した。フルオロキノロン耐性株が感受性株に比べて定着性が優れている可能性があるという報告 [6] もあるが、定着した株を投薬によって排除することは困難ではないと考えられた。キノロン耐性

は DNA ジャイレースの変異に起因し、一般にフィットネスコストが上昇するとされることから、株の生存性が排除効率に影響を与えた可能性も考えられる。ただし、感染個体による差異も否定はできないため、分離株における増殖性などの追加調査が必要と考えられた。

大腸菌の薬剤感受性試験では、投薬に選択した ABPC について耐性率に変化は認められず、本調査においては投薬による常在菌の薬剤耐性獲得への影響は少ないものと考えた。一方、SM 及び TC について投薬前後で耐性率が上昇傾向にあったが、その原因は不明であった。さらに、一般に CEZ の耐性率は ABPC の耐性率と相関することが知られるが今回は耐性率に大幅な差が見られた。CEZ における阻止円の値は「中間」の値の周辺に多く分布しており、測定時のずれで耐性・感性の評価が大きく異なってくる可能性がある。詳細な耐性率の評価のためには微量液体希釈法を選択することでより明確な結果が得られると期待できる。

今回は投薬に ABPC を選択したが、その他の薬剤の投薬効果についても今後調査が望まれる。

なお、本病発生時の問題点として、Cf の亜種同定は防疫上重要で必ず実施すべきものである一方で、前述のとおり要綱には本病の対策における亜種の区別がない。このため、亜種による性状の違いを要綱等に反映することで本病の対策方針がより明確になるものと考えられる。

稿を終えるにあたり、本調査にご協力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人獣共通感染症研究領域腸管病原菌グループ岩田剛敏先生に深謝いたします。

引用文献

- [1] 菊地直哉：牛カンピロバクター症、動物の感染症、明石博臣編、第3版、121-122、近代出版、東京（2011）
- [2] G I Giacoboni, Itoh K, Hirayama K, Takahashi E, Mitsuoka T : Comparison of fecal *Campylobacter* in calves and cattle of different ages and areas in Japan, J Vet Med Sci, 55, 555-559(1993)
- [3] Abril C, Vilei E M, Brodard I, Burnens A, Frey J, Miserez R : Discovery of insertion element IS*CfeI*: a new tool for *Campylobacter fetus* subspecies differentiation, Clin Microbiol Infec, 13, 993-1,000(2007)
- [4] 品川邦汎：カンピロバクターをめぐる最近の話題、牛の内臓肉（肝臓）の汚染とその防止、獣医畜産新報、60、895-899（2007）
- [5] 見澤尚明：カンピロバクター感染症、モダンメディア、51、45-52（2005）
- [6] Luo N, Pereira S, Sahin O, Lin J, Huang S, Michel L, Zhang Q : Enhanced in vivo fitness of fluoroquinolone-resistant *Campylobacter jejuni* in the absence of antibiotic selection pressure, Proc Natl Acad Sci USA, 102, 541-546(2005)