

# 牛乳房炎抗菌剤治療 ガイドブック



農林水産省平成 29 年度生産資材  
安全確保対策委託事業  
抗菌性物質薬剤耐性評価情報  
整備委託事業

第 1.1 版

# 目次

|                                                  |    |
|--------------------------------------------------|----|
| はじめに                                             | 2  |
| 牛乳房炎における抗菌剤使用の考え方と治療の有効性の評価                      | 2  |
| 抗菌剤の適正使用と慎重使用                                    | 3  |
| 薬剤耐性とバイオフィルム                                     | 4  |
| 突然変異阻止濃度 (Mutant Prevention Concentration : MPC) | 6  |
| 臨床現場における乳房炎原因菌の微生物学的簡易同定法と薬剤感受性試験 (ディスク拡散法)      | 7  |
| 1. グラム陽性・陰性細菌の同定法と薬剤感受性試験 (ディスク拡散法)              |    |
| 2. マイコプラズマの同定法                                   |    |
| 牛乳房炎由来株に対する各薬剤の感受性成績と薬剤耐性菌の発生を低減するための抗菌剤使用の考え方   | 19 |
| 1. 乳房炎治療の実態と抗菌剤使用に関する課題                          |    |
| 2. 好気培養細菌陰性の場合の対応について                            |    |
| 3. グラム陽性・陰性細菌における薬剤感受性成績 (MIC, MBC, MBEC)        |    |
| 4. マイコプラズマにおける薬剤感受性成績 (MIC, MBC)                 |    |
| 本事業で検討したディスク法による薬剤感受性判定基準とその評価                   | 26 |
| 牛乳房炎の病態・診断・治療・予防 (グラム陽性・陰性細菌)                    | 27 |
| 牛乳房炎の病態・診断・治療・予防 (マイコプラズマ)                       | 35 |
| 牛乳房炎の予防 (環境衛生、ワクチン等)                             | 40 |
| 参考文献                                             | 44 |
| おわりに                                             | 50 |

## はじめに

牛の乳房炎は、乳牛の疾病の中で、酪農家に対し最も甚大な損失を与えている疾病であり、生乳生産上の最も大きな損耗要因として、また公衆衛生上、安全な原料乳生産を行う上でも酪農業界の喫緊の課題となっている。乳房炎を効果的に制圧するためには、治療と予防が共に相乗的に機能しなければならない。乳房炎の治療は主に抗菌剤の投与によって行われているが、抗菌剤の不適切な使用による治療後の残留事故や薬剤耐性の問題などもあり、食の安全・安心や薬剤耐性の観点から抗菌剤の適正使用が強く求められている。特に薬剤耐性菌の増加に関しては、世界的にも大きな問題となっており、臨床現場での動物用抗菌剤の適切な使用を促すことは、薬剤耐性菌の出現を抑え、社会に大きく貢献することとなる。

この牛乳房炎抗菌剤治療ガイドブックは、乳房炎治療に対する適切な抗菌剤の選択と適正な治療を行うために必要な基礎データ及び適切な診断・治療・予防に関する考え方について情報提供し、それを臨床現場に普及することを目的として作成されたものである。

## 牛乳房炎における抗菌剤使用の考え方と治療の有効性の評価

牛の乳房炎は、原因となる微生物が乳頭から侵入し乳腺に定着することによって感染が成立する。また、原因菌の種類によって症状が相違し、治療効果もそれらの特性に左右されることから、原因菌に基づいた対応を行うことが乳房炎の早期治癒、発生予防に重要である。病原体の持つ特性は、その病原性と関連があり、宿主の免疫応答は多くの環境要因によって影響を受ける。乳房炎を引き起こす病原体は、感受性宿主に感染を引き起こす。行った治療が奏功するかどうかは、宿主側の免疫要因、病原体の感染性、病原性、薬剤耐性、そして使用薬剤の作用機序と特徴、投与経路、体内動態などの相互作用により左右される。したがって、薬剤による治療は、宿主の持つ自然防御能を補助するものであることを治療の基本的な概念として持つことが重要である。

乳房炎の治療は、抗菌剤、消炎剤などを使用して病原体の除去、宿主免疫を

補助し、または感染による病態生理学的反応を低減させることである。臨床現場では、よく抗菌剤投与による病原体の除去に焦点がおかれるが、乳腺内感染に対する治療の有効性は、臨床徴候の低減により評価することが適切と考えられる。その理由は、治療の目的が市場取引に耐えうる乳質を保持し、その牛が長期間生存し経済的に貢献するところにあるからである。一方で、微生物学的培養検査の結果により原因菌の特徴に基づいた適切な処置を施すことで効果的な治療を実施することができ、結果として抗菌剤の使用を必要最小限に減らすことができる。したがって、その牛の病態と原因菌の特徴をよく理解した上で、総合的に治療効果を評価することが重要である。

## 抗菌剤の適正使用と慎重使用

牛用の抗菌剤は、「要指示医薬品」となっている。そのため、飼養者が抗菌剤を入手するには、獣医師の処方箋や指示書が必要である（要指示医薬品制度）。また、獣医師は、処方箋や指示書を発行するには、対象動物を自ら診察する必要がある（要診察医薬品制度）。さらに、畜産物中に使用した薬剤が残留することを防止するため、動物用抗菌剤が使用できる動物、用法・用量、使用禁止期間などが法令で規制されている（使用規制制度）。以上のような法令及び用法・用量を遵守し、使用上の注意に従って使用することを「適正使用」という。

乳房炎に対して抗菌剤の「適正使用」が行われなかった場合、例えば、畜産物中への薬剤の残留、耐性菌の出現、疾患の慢性化等につながる可能性があるので注意が必要である。

要指示医薬品制度または使用規制制度の違反には3年以下の懲役か300万円以下の罰金またはその両方、また、要診察医薬品制度の違反には20万円以下の罰金という罰則が法律で定められていることに注意が必要である。

2015年5月にWHOが薬剤耐性に関するグローバルアクションプランを採択し、薬剤耐性に関して関連分野が連携して世界的に取り組むべきとされたことを踏まえ、2016年4月に我が国においてアクションプランが策定・公表された。このアクションプランにおいて、動物用抗菌剤の慎重使用の徹

底を行うことが記載されている。

「慎重使用」とは、抗菌剤を使用すべきかどうかを十分検討した上で（薬剤感受性試験の実施、感染症の予防、抗菌剤関連情報の共有等）、抗菌剤の「適正使用」により最大限の効果を上げ、薬剤耐性菌の選択を最小限に抑えるように使用することをいう（図1参照）。

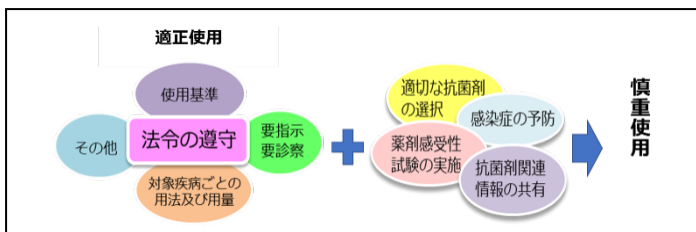


図1. 適正使用と慎重使用の違いについて

慎重使用の目標は主に以下の3点である。

- ① 家畜での薬剤耐性菌の選択及び伝播を極力抑えること
- ② 家畜から人への薬剤耐性菌又は薬剤耐性決定因子の伝播を抑え、人の医療に使用する抗菌性物質製剤の有効性を維持すること
- ③ 家畜での抗菌剤の有効性を維持すること

## 薬剤耐性とバイオフィルム

薬剤耐性菌とは、抗菌剤存在下でも発育できる細菌のことをいう。細菌は、独自の耐性機構を作り出したり（染色体の突然変異等）、抗生物質産生菌や他の薬剤耐性菌が持つ耐性遺伝子を取り込んだり（耐性の伝達）する（図2）。耐性遺伝子の獲得はほぼ一定の確率で起こっている現象であり、抗菌剤の存在の有無には依存しないが、薬剤耐性菌はその抗菌剤が存在するときに感受性菌と比べて有利に増殖するため、抗菌剤の使用は薬剤耐性菌の出現と強く関わる。以上のような背景より、薬剤耐性菌の出現・拡散を防ぐために、獣医師は科学的根拠に基づいて抗菌剤の慎重使用を行うべきである。

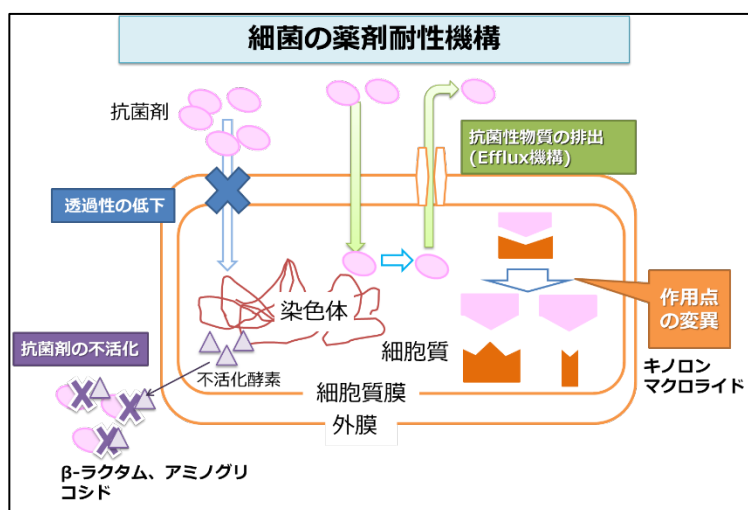


図 2. 細菌の主な薬剤耐性機構（「畜産物生産における動物用抗菌性物質の慎重使用に関する基本的な考え方について」より；

[http://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/yakuzi/pdf/vet\\_panf\\_prudent\\_use.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/yakuzi/pdf/vet_panf_prudent_use.pdf)）

また、多くの細菌感染症において、薬剤感受性と臨床効果は必ずしも一致するものではないが、薬剤感受性試験は臨床的有用性が高く、抗菌剤治療の科学的根拠となることから積極的に実施すべきである。実際、牛の呼吸器感染症に対して、薬剤感受性試験に基づく治療を行った方が治療成績はよいことが報告されている[1]。一方で、薬剤感受性試験において細菌が感受性を示すにも関わらず、抗菌剤が有効に作用しないことや、一度症状が改善した後に細菌感染症を再発することがある。こうした現象の一部は、バイオフィームが関連していることが示唆されている[2]。バイオフィームとは、細菌が菌体外に分泌する多糖類などのマトリックスと菌の集合体から成る構造物である。細菌が付着・増殖するとマトリックスに覆われた状態、すなわちバイオフィームを形成して薬剤に抵抗性を示し、また生体の防御機構からも逃れやすくなるために治療が困難になることが知られている。バイオフィームは生体内でも産生されることから、呼吸器感

染症や尿路感染症などの様々な細菌感染症においても、慢性感染症、再発や再感染の原因となっていることが示されている[3]。こうした背景より、獣医療現場における乳房炎においても、慢性乳房炎や再発は細菌の形成するバイオフィルムの関連が疑われる。また、バイオフィルムは細菌の薬剤耐性遺伝子の伝達に寄与するという報告もある[4]。従って、細菌がバイオフィルムを形成し、治療困難となる前に適切な抗菌剤で治療することが最も重要であると考えられる。

### 突然変異阻止濃度 (Mutant Prevention Concentration : MPC)

細菌は分裂のたびに、一定の比率で変異株が出現する。変異株の中には、抗菌剤に対する感受性が変化し MIC(最小発育阻止濃度, minimum inhibitory concentration)が高い値を示すことがあり、この現象が薬剤耐性菌出現のメカニズムの一つとして知られている。抗菌剤の濃度が MIC 値以上では、細菌の発育は抑制される。この濃度のときに出現した変異株は MIC より高いある値(MPC, mutant prevention concentration)以上では発育が抑制される。つまり、耐性菌も発育が抑制される濃度が MPC である。一般的に、MIC と MPC の間の濃度域を MSW(mutant selection window)と呼び、耐性菌が選択されやすい濃度であることが知られている。MSW の濃度域を決定する要因は明らかではないが、MSW の濃度域が広い菌では、耐性菌が出現し易いと考えられる。乳房炎起因菌に対しても、MSW を意識した PK-PD 理論に基づいた抗菌剤の使用が重要である。抗菌剤の血中濃度と MIC, MPC, MSW の関係を図 3 に示す。

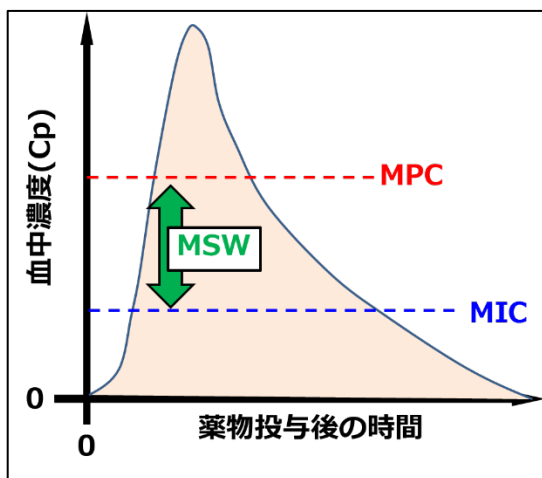


図 3. 抗菌剤の血中濃度と MIC, MPC, MSW の関係

## 臨床現場における乳房炎原因菌の微生物学的簡易同定法と薬剤感受性試験（ディスク拡散法）

### 1. グラム陽性・陰性細菌の同定法と薬剤感受性試験（ディスク拡散法）

一般的に乳房炎原因菌の微生物学的同定手法には、培養法、生化学的同定手法、分子生物学的同定手法などが存在する。ここでは臨床現場での活用を主眼に置いていることから、以下の主要な乳房炎原因菌について、平板培地を用いた乳汁の培養と簡単な生化学的性状検査を行うことにより、コロニーの形、大きさ、色、光沢、臭気などを参考に目視で同定する手法を紹介する[5]。

目視同定可能な菌種は以下のとおりである。

#### ・グラム陽性菌

*Staphylococcus aureus*, coagulase negative staphylococci (CNS), *Streptococcus* spp., *Enterococcus* spp., *Trueperella pyogenes* (旧 *A. pyogenes*), *Corynebacterium bovis*, *Bacillus cereus*

## ・グラム陰性菌

*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*,  
*Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella multocida*

## ・その他の微生物

Yeast, *Prototheca bovis* (旧 *P. zopfii*), *Mycoplasma* spp.

## 乳汁の採材手法

乳房炎原因菌を特定するための乳汁採材は極めて注意深く行う必要がある。できるだけ他からの雑菌混入を避けるためには、搾乳後の後搾り乳を採材することが望ましい。推奨される採材方法は以下のとおりである。

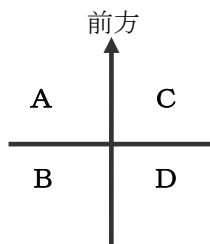
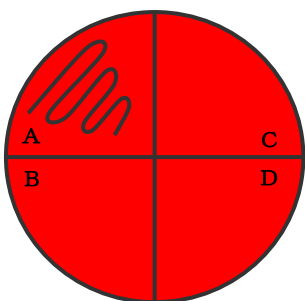
- ① 滅菌スピッツ管を用意する(スピッツ管に牛番号、分房等の情報を記入)
- ② 搾乳直後に採材分房の乳頭表面の湿り気をペーパータオルにて取る
- ③ アルコール綿花で乳頭口を良く清拭する
- ④ スピッツ管の蓋を汚染しないように外して保持し、スピッツ管を斜めにして2mL 程度乳汁を採取する
- ⑤ 採取したスピッツ管の蓋を閉める
- ⑥ 採材した乳頭をポストディッピングする
- ⑦ 保冷容器にスピッツ管を入れ、検査するまで保管し、速やかに培地に塗布する

## 細菌培養の手法

### 1. 一般細菌の好気培養

#### (1) 血液寒天培地を利用した方法

- 1) 5%羊血液加寒天培地を4分割し、被検乳汁をよく攪拌してからマイクロピペットまたはデスポ白金耳(10 $\mu$ L ループ)で 10 $\mu$ L を取り、培地に塗布する。ただし、デスポ白金耳で計量した場合、塗布量が少なくなる傾向にあるので注意を要する[6]。



2) 恒温器内で 37℃24～48 時間培養する。

3) 恒温器から培地を取り出し目視同定する。

・グラム陽性球菌、グラム陰性桿菌は、培養 24 時間後の判定が最も同定しやすい。グラム陽性桿菌、*Prototheca bovis*、Yeast については、48 時間の方が判定しやすい場合がある。

・目視同定をするに当たっての原因菌の特徴は、図5～20 に示す通りである。まずコロニーの大きさを大、中、小、微小の4グループに分類して記憶しておくとう理解しやすい。熟練すれば正確に同定することが可能である(P11 フローチャート参照)。

(2) 乳汁または乳汁中凝固物の直接塗抹標本に対する染色

被検乳汁をスライドグラスに直接塗抹し、自然乾燥して火炎固定後、冷却してグラム染色を実施することにより、グラム陽性球菌、グラム陽性桿菌、グラム陰性桿菌、酵母様真菌、藻類の鑑別を行うことができる。この方法は、薬剤の選択や甚急性乳房炎の治療に初診から迅速に対応する必要がある場合に有効である。主に *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., Yeast, *Prototheca bovis* などが対象菌種となる。

(3) 英膜二重染色による *E. coli* と *K. pneumoniae* の簡易鑑別法

被検乳汁をスライドグラスに直接塗抹し、自然乾燥した後、簡易迅速染色液にて先にギムザ染色を行い、水洗乾燥させる。次に、市販の書道用墨汁を1滴スライドグラス上にのせ、血液塗沫を引く要領で墨汁染色を行い、水洗せずそのまま自然乾燥させ、顕微鏡で英膜および菌体を観察する。判定は、青色に染まった菌体の周囲に透明帯として観察される英膜が厚いものが *K. pneumoniae* で、

透明帯がほとんど見えない、あるいは薄いものは *E. coli* と判断する。これは、*E. coli* より重症化する *K. pneumoniae* の初診時の鑑別に有効である。

#### (4) その他の詳細な同定方法

グラム陽性球菌・桿菌、グラム陰性桿菌についての目視同定以上の詳細な同定は、比較的簡易な生化学的キットが市販されており、それを用いて同定することができる。

## 2. 一般細菌の嫌気培養

- 1) 5%羊血液加寒天培地を4分割し、被検乳汁をよく攪拌してからマイクロピペットまたはデスポ白金耳(10 $\mu$ L ループ)で10 $\mu$ L を取り、培地に塗布する。
- 2) 嫌気ジャーに嫌気パックを入れ、酸素0%、炭酸ガス5%以上の環境下で、恒温器内にて 37℃24～48 時間培養する(図4)。
- 3) 嫌気ジャーから培地を取り出し、発育したコロニーを一つ釣菌し、2枚の血液寒天培地に塗布し、1枚は好気培養、1枚は嫌気培養する。
- 4) 24～48 時間培養後、好気培養で発育したものは通性嫌気性菌(好気性菌)である。好気培養で発育陰性、嫌気培養で発育陽性のもの(偏性嫌気性菌:嫌気性菌)を生化学的検査または分子生物学的検査で同定する。

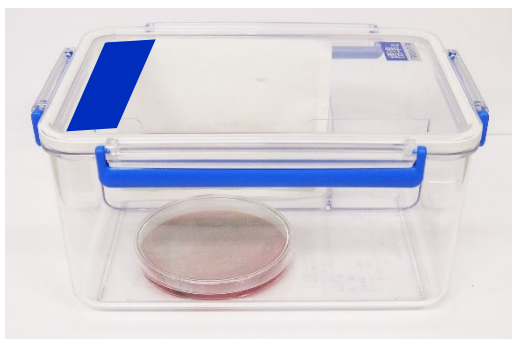
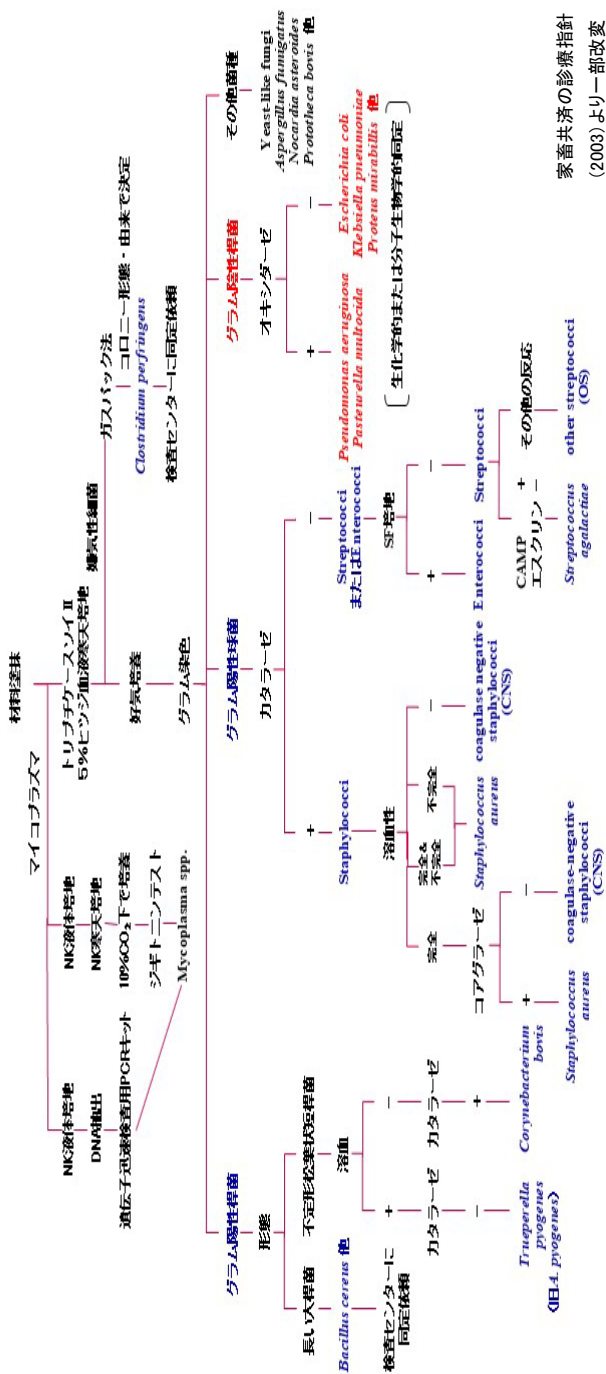


図 4. 嫌気ジャーと平板培地

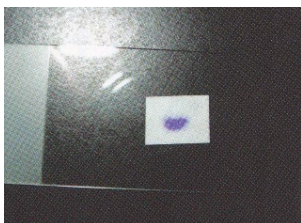
臨床的・實際的な牛乳房炎原因菌同定手順



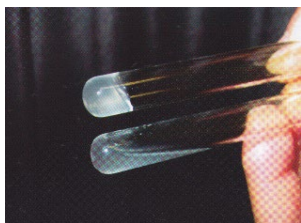
## 簡易な生化学的検査



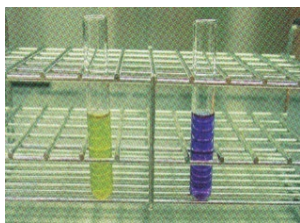
カタラーゼ試験（オキシドール）  
泡あり：陽性、泡なし：陰性



オキシダーゼ試験（1分以内）  
青色：陽性、無色：陰性



コアグララーゼ試験  
凝固あり：陽性、凝固なし：陰性



SF 試験  
黄色：陽性、青色：陰性

### ・カタラーゼ試験

スライドガラスにオキシドールを滴下し、菌株を浸す。泡が出るとカタラーゼ陽性である。（主に *Staphylococcus* と *Streptococcus* の鑑別）

### ・オキシダーゼ試験

オキシダーゼ試験紙にわずかの水を垂らし、菌株を接触させる。1分以内に青色に変化したらオキシダーゼ陽性

### ・コアグララーゼ試験

ウサキプラズマを規定量の滅菌生理食塩水に溶かし小試験管に分注、菌株を接種し、3時間と24時間に判定する。凝固するとコアグララーゼ陽性。

### ・SF 試験

SF 培地を作成し小試験管に分注、24 時間後に黄色く変化すれば SF 陽性。