

乳房炎原因菌の目視同定



図 5. *Staphylococcus aureus*
: 乳白色スムーズ中コロニー
(完全溶血帯と不完全溶血帯)



図 6. coagulase negative staphylococci
: 乳白色スムーズ中コロニー

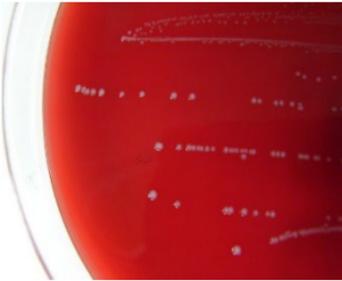


図 7. *Streptococcus uberis*
: 灰色スムーズ小コロニー



図 8. *Trueperella pyogenes*
: 灰色スムーズ微小コロニー (完全溶血)



図 9. *Corynebacterium bovis*
: 乳白色ラフ小コロニー、乾燥様、
溶血なし

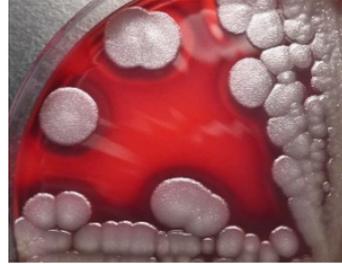


図 10. *Bacillus cereus*
: 灰色大ラフ光沢なし大コロニー
(完全溶血)



図 11. *Escherichia coli*
: 灰色不整形大コロニー



図 12. *Klebsiella pneumoniae*
: 乳白色スムーズ大コロニー、
光沢あり



図 13. *Proteus mirabilis*
：灰色不整形でスウォーミングを認める



図 14. *Serratia marcescens*
：赤色大スムーズコロニー



図 15. *Pseudomonas aeruginosa*
：完全溶血帯、線香臭、不整形大コロニー



図 16. *Pasteurella multocida*
：鼻汁様ムコイド大コロニー、
光沢あり、



図 17. Yeast-like fungi
：乳白色光沢のない小コロニー

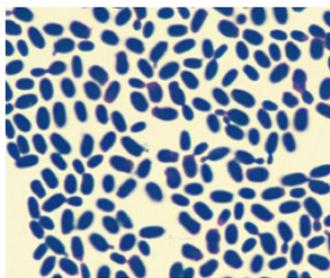


図 18. Yeast-like fungi 鏡検像：
グラム陽性、米粒様の大きな菌体
を認める



図 19. *Prototheca bovis*
：灰色不整形微小～小コロニー、
光沢なく粉っぽい

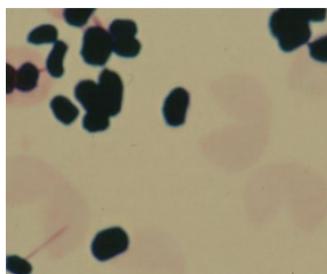


図 20. *Prototheca bovis* 鏡検像
：酵母様真菌の5～10倍の岩石状
の菌体と外殻が観察される

薬剤感受性試験(ディスク拡散法)

ここでは臨床現場で簡易でより正確なディスク拡散法の間接法について解説する。また常法ではマックファーランド 0.5 の菌液を用いるが、それに相当するコロニー数に換算して釣菌する方法を紹介する。

具体的な手法

1. 目視同定された細菌を純培養し、菌種ごとに表 1 のコロニー数を釣菌し、
Staphylococcus, グラム陰性菌はミューラーヒントン培地に、*Streptococcus* とグラム陽性桿菌は5%羊血液加ミューラーヒントン培地(5%羊血液加寒天培地で代用可)に綿棒で培地を回転させながら全域に均一に塗布する
2. 感受性ディスクを塗布した培地に置き、37°C24 時間培養する
3. 阻止円の直径を計測し、表2の「本事業で検討した牛乳房炎原因菌に対する薬剤感受性判定表」に基づき判定する

表 1. 感受性培地塗布時の各菌種における釣菌コロニー数

菌種	釣菌コロニー数	使用培地
<i>Staphylococcus</i> spp. <i>Micrococcus</i> spp.	2~3	ミューラーヒントン
<i>Streptococcus</i> spp. <i>Enterococcus</i> spp.	20~30	5%羊血液加寒天培地
<i>Corynebacterium</i> spp. <i>Trueperella pyogenes</i>	50~100	5%羊血液加寒天培地
Gram negative bacteria <i>Bacillus cereus</i>	1/4~1/8	ミューラーヒントン

家畜共済の診療指針(2003)より一部改変

表 2. 本事業で検討した牛乳房炎原因菌に対する薬剤感受性判定表

抗菌薬	対象菌種	阻止円の直径(mm)	
		感性(S)	耐性(R)
PC	<i>Staphylococcus aureus</i>	≧ 24	≦ 23
	CNS	≧ 12	≦ 11
	<i>Streptococcus</i> spp.	≧ 14	≦ 13
	Strep. (<i>S. uberis</i> を除く)	≧ 14	≦ 13
	<i>Streptococcus uberis</i>	≧ 18	≦ 17
	<i>Enterococcus</i> spp.	≧ 21	≦ 20
	<i>Trueperella pyogenes</i>	≧ 20	≦ 19
OTC	<i>Staphylococcus aureus</i>	≧ 12	≦ 11
	CNS	≧ 17	≦ 16
	<i>Streptococcus</i> spp.	≧ 13	≦ 12
	Strep. (<i>S. uberis</i> を除く)	≧ 13	≦ 12
	<i>Streptococcus uberis</i>	≧ 16	≦ 15
	<i>Enterococcus</i> spp.	≧ 19	≦ 18
	<i>Trueperella pyogenes</i>	≧ 20	≦ 19
	<i>Escherichia coli</i>	≧ 16	≦ 15
<i>Klebsiella</i> spp.	≧ 15	≦ 14	
KM	<i>Staphylococcus aureus</i>	≧ 13	≦ 12
	CNS	≧ 16	≦ 15
	<i>Streptococcus</i> spp.	≧ 26	≦ 25
	Strep. (<i>S. uberis</i> を除く)	≧ 26	≦ 25
	<i>Streptococcus uberis</i>	≧ 22	≦ 21
	<i>Enterococcus</i> spp.	≧ 14	≦ 13
	<i>Trueperella pyogenes</i>	≧ 15	≦ 14
	<i>Escherichia coli</i>	≧ 15	≦ 14
<i>Klebsiella</i> spp.	≧ 15	≦ 14	
CEZ	<i>Staphylococcus aureus</i>	≧ 25	≦ 24
	CNS	≧ 17	≦ 16
	<i>Streptococcus</i> spp.	≧ 19	≦ 18
	Strep. (<i>S. uberis</i> を除く)	≧ 19	≦ 18
	<i>Streptococcus uberis</i>	≧ 19	≦ 18
	<i>Enterococcus</i> spp.	≧ 33	≦ 32
	<i>Trueperella pyogenes</i>	≧ 15	≦ 14
	<i>Escherichia coli</i>	≧ 15	≦ 14
<i>Klebsiella</i> spp.	≧ 15	≦ 14	
CXM	<i>Staphylococcus aureus</i>	≧ 16	≦ 15
	CNS	≧ 17	≦ 16
	<i>Streptococcus</i> spp.	≧ 15	≦ 14
	Strep. (<i>S. uberis</i> を除く)	≧ 17	≦ 16
	<i>Streptococcus uberis</i>	≧ 15	≦ 14
	<i>Enterococcus</i> spp.	≧ 11	≦ 10
	<i>Trueperella pyogenes</i>	≧ 12	≦ 11
	<i>Escherichia coli</i>	≧ 14	≦ 13
<i>Klebsiella</i> spp.	≧ 15	≦ 14	
EM	<i>Staphylococcus aureus</i>	≧ 15	≦ 14
	CNS	≧ 15	≦ 14
	<i>Streptococcus</i> spp.	≧ 14	≦ 13
	Strep. (<i>S. uberis</i> を除く)	≧ 12	≦ 11
	<i>Streptococcus uberis</i>	≧ 14	≦ 13
	<i>Enterococcus</i> spp.	≧ 17	≦ 16
	<i>Trueperella pyogenes</i>	≧ 18	≦ 17
	<i>Escherichia coli</i>	—	—
<i>Klebsiella</i> spp.	≧ 16	≦ 15	
GM	<i>Staphylococcus aureus</i>	≧ 12	≦ 11
	CNS	≧ 13	≦ 12
	<i>Streptococcus</i> spp.	≧ 16	≦ 15
	Strep. (<i>S. uberis</i> を除く)	≧ 16	≦ 15
	<i>Streptococcus uberis</i>	≧ 18	≦ 17
	<i>Enterococcus</i> spp.	≧ 11	≦ 10
<i>Trueperella pyogenes</i>	≧ 15	≦ 14	

表 2 つづき

抗菌薬	対象菌種	阻止円の直径	
		感性(S)	耐性(R)
ABPC	<i>Staphylococcus aureus</i>	≧ 25	≦ 24
	CNS	≧ 19	≦ 18
	<i>Streptococcus</i> spp.	≧ 17	≦ 16
	Strep. (<i>S. uberis</i> を除く)	≧ 17	≦ 16
	<i>Streptococcus uberis</i>	≧ 17	≦ 16
	<i>Enterococcus</i> spp.	≧ 17	≦ 16
	<i>Trueperella pyogenes</i>	≧ 17	≦ 16
	<i>Escherichia coli</i>	≧ 11	≦ 10
	<i>Klebsiella</i> spp.	≧ 11	≦ 10
ERFX	<i>Staphylococcus aureus</i>	≧ 15	≦ 14
	CNS	≧ 19	≦ 18
	<i>Streptococcus</i> spp.	≧ 13	≦ 12
	Strep. (<i>S. uberis</i> を除く)	≧ 13	≦ 12
	<i>Streptococcus uberis</i>	≧ 14	≦ 13
	<i>Enterococcus</i> spp.	≧ 17	≦ 16
	<i>Trueperella pyogenes</i>	≧ 15	≦ 14
	<i>Escherichia coli</i>	≧ 16	≦ 15
	<i>Klebsiella</i> spp.	≧ 19	≦ 18
MBFX	<i>Staphylococcus aureus</i>	≧ 15	≦ 14
	CNS	≧ 17	≦ 16
	<i>Streptococcus</i> spp.	≧ 15	≦ 14
	Strep. (<i>S. uberis</i> を除く)	≧ 16	≦ 15
	<i>Streptococcus uberis</i>	≧ 14	≦ 13
	<i>Enterococcus</i> spp.	≧ 15	≦ 14
	<i>Trueperella pyogenes</i>	≧ 15	≦ 14
	<i>Escherichia coli</i>	≧ 16	≦ 15
	<i>Klebsiella</i> spp.	≧ 16	≦ 15

注) *S. uberis* を同定していない場合は Strep. (*S. uberis* を除く)の基準を利用する。

PC: ペニシリン、OTC: オキシテトラサイクリン、KM: カナマイシン、

CEZ: セファゾリン、CXM: セフロキシム、EM: エリスロマイシン、

GM: ゲンタマイシン。ABPC: ペニシリン ERFX: エンロフロキサシン、

MBFX: マルボフロキサシン

2. マイコプラズマの同定法

本病の微生物学的検査には培養法[7]および遺伝子検査を基礎とした遺伝子迅速検査法[8, 9]がある。特に遺伝子迅速検査法は従来の培養法に比べ感度および特異度が高く、さらに多検体処理や迅速性(採材から 72 時間程度で判定)においても非常に優れている。また、検査コストの低減も見込めることから、大規模牛群における感染個体の摘発を行う上においては特に有用である。培養法については、病性鑑定マニュアル(農林水産省)に記載の方法も参考にされた(http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_byosei-kantei2016/cow-diseases/046.pdf)。

【遺伝子迅速検査法】 現在、国内では培養検査と遺伝子検査の利点を組み

合わせたハイブリッド型の新しい遺伝子迅速検査技術が用いられている[7]。実施例として 0.1mL の乳汁を3mL のマイコプラズマ液体培地に接種し 72 時間程度培養する。培養液より DNA を簡易粗精製したのち、Universal プライマーを用いた PCR を実施し、陽性だった検体については引き続き、菌種特異的プライマーを用いた PCR を実施する(図 21)。PCR 法は培養法に比較して多くの利点を有し、比較的操作も簡便であるが、分子生物学的な基礎知識や基本技術は必要となる。検査者の技術や検査システムが不適切である場合は、検査結果の信頼性を損ない、逆に農場に大きな混乱を招くため、検査の精度管理にあっては十分に留意しなければならない。

推奨検査資材

【培養法および遺伝子迅速検査に用いる培地】

マイコプラズマ用液体培地

マイコプラズマ用平板培地

【遺伝子迅速検査用 PCR キット】

遺伝子迅速検査用 PCR キットは、ウシに感染するマイコプラズマ種の検出を目的に開発された商品を使用する。培養液や培養細胞のコンタミネーションをチェックするための検出キットは、アコレプラズマ等、ウシで病原性を持たないマイコプラズマ種を「陽性」として検出するため、誤診が生じる危険性がある。必ず、「ウシ用」のキットを用いなければならない。日本国内では、ウシに感染性をもつマイコプラズマ種を網羅的に検出する PCR キットと、*M. bovis*, *M. bovisgenitalium*, *M. californicum* の菌種同定用キットが販売されている。

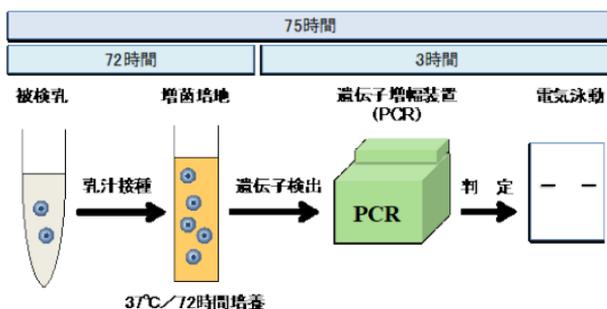


図 21. マイコプラズマの遺伝子検査法の概要

【培養法】

被検乳汁をマイコプラズマ液体培地に接種し 37°Cで 48～72 時間培養する。この増菌液をマイコプラズマ液体培地に塗布し3～14 日程度、37°C、微好気下で培養する。目玉焼き状コロニーを顕鏡下で分離し、単離培養を行ったのち、ジギトニンディスクアッセイによりアコレプラズマとの識別を行う。サンプリングから最終的な同定まで概ね 10 日～1ヶ月程度必要となる。

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

1. 乳房炎治療の実態と抗菌剤使用に関する課題

(1) 乳房炎治療の実態

乳房炎の治療の大部分は抗菌剤による治療である(表3)。

表 3. 乳房炎治療における抗菌剤使用の現状

・細菌陰性	抗菌剤注入	28.8%	} 97.7%
・グラム陽性菌	} 抗菌剤の注入、注射		
・グラム陰性菌			
・マイコプラズマ			
・真菌	頻回搾乳、抗真菌薬	2.2%	
・藻類	淘汰	0.1%	

2015 年の家畜感染症学会での全国の獣医師に向けたアンケート調査^[10]および追加調査の結果から、まず 99%の獣医師が乳房炎は重要な疾病であると認識し、97%の獣医師が乳房炎低減のために力を注ごうと思っているという結果が得られた。そして、99%の獣医師が原因菌同定のための細菌検査は必要であると認識し、62%の獣医師が診療所において自ら細菌検査を実施しており、実施することがある獣医師も含めると、実施率は 81%にも上ることが明らかとなった。しかし一方で、細菌検査は時間がかかることや、菌名までの同定が困難であること、一定の熟練を要することなどから、敬遠している獣医師が少なくないこ

とも実態として明らかとなった。また、薬剤感受性試験は 80%以上の獣医師が行っており、そのほとんどが結果を治療に活用していた。

臨床型乳房炎の治療においては、抗菌剤の全身投与を行う場合は獣医師の判断によって投与中止を決定しているが、局所治療の場合は、97%の獣医師が乳房炎軟膏を薬治し、獣医師の指示のもと、農家が治癒を確認している場合があった。また最も経済的損失の大きい Coliform 乳房炎に使用する全身投与の抗菌剤の選択においては、地域により差が見られたが、カナマイシン、オキシテトラサイクリン、フルオロキノロンの使用が多かった。しかしながら、フルオロキノロンの使用については、本来は二次選択薬として使用するべき抗菌薬であることから、現場の治療を鑑みてやむなく一次選択薬として使用する場合には限定した症例とし、用法用量は遵守したうえで長期投与は避けるなどの必要がある。またある地域では、乳房炎スコア2以下(局所症状のみ)の乳房炎であっても恒常的に併用して抗菌剤の全身投与を行っている事例も見られ、このような治療も耐性菌を作出する要因につながっていると思われた。

(2) 使用抗菌剤の種類と使用量

2014 年における全ての動物用抗菌剤(駆虫薬を除く)の販売量(原末換算)は、753t である。そのうち乳房炎軟膏は、2.5t (0.3%)を占める。また同期における乳房炎軟膏の販売量から推定した使用本数の概算では、セファゾリン(泌乳期・乾乳期)が最も多く、次いでペニシリン系乳房炎軟膏(泌乳期・乾乳期)、セファロニウム(乾乳期)、セフロキシム(泌乳期)となっており、圧倒的にセフェム系抗菌剤の偏重使用が明らかとなった(図 22)。

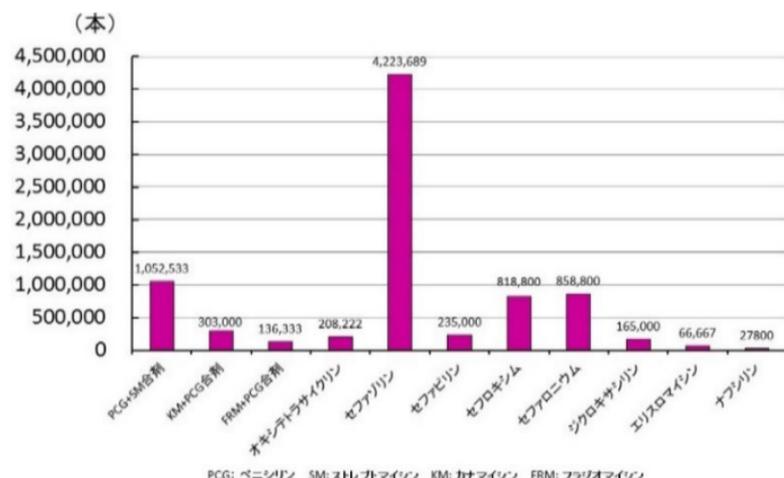


図 22. 乳房注入剤使用本数概算 (2014)
(富士経済のデータを基に河合が算出)

乳房炎牛の治療において、1日当たりの乳房炎軟膏使用本数の調査を行ったところ、府県のある地域においては用法の1日1回注入ではなく、1日2回注入が励行されていることが明らかとなった。そこでセフェム系抗菌剤を使用して治療した症例において1日1回注入と2回注入の3日以内治癒率を比較してみたところ、1回注入 50.0%であったのに対し、2回注入では 78.6%と有意に高かった。また、使用抗菌剤をセフェム系に統一し、初診にセファゾリン感性のもので注射薬無使用の症例について平均使用本数を比較したところ、治療日数6日以内では、1日注入回数1回の場合、平均治療日数が3.8日、平均使用本数が3.8本で、2回の時は平均治療日数3.45日、平均使用本数が6.9本であった(表4)。1日1回注入は2回注入よりも治癒まで0.35日延長するが抗菌剤を3.1本少なくできることから、抗菌剤の使用削減の観点から、グラム陽性菌については現在の用法用量の規定通り、治療は1日1回注入を行うべきであることが示唆された。

表 4. グラム陽性菌乳房炎の治療日数と抗菌剤使用本数

グラム陽性菌		治療累積日数と症例数(平均使用本数)				
1日注入回数	使用薬剤	0~3日	0~6日	0~9日	0~21日	0~45日
1回	セフェム系	51(2.9)	73(3.8)	85(4.4)	99(5.7)	102(6.5)
2回	セフェム系	11(5.8)	14(6.9)			

※注射薬は併用していない

6日までの平均治療日数: 1回注入(3.8日)、2回注入(3.45日)

(2016年調査442症例のうちセファム系抗菌剤使用116例)

2. 好気培養細菌発育陰性の場合の対応について

臨床型乳房炎乳を培地に塗布し好気培養を実施した場合、25~30%の検体について細菌の発育が陰性(NG)である。これらのおよそ半数は自然治癒する場合が多く、このような場合の治療の対応については考慮すべき点がある。

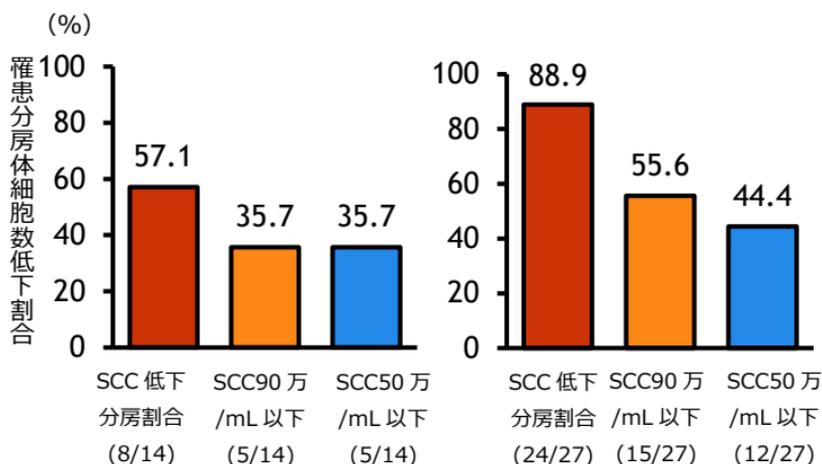


図 23. NG 乳房炎無治療 6 日後、分房乳体細胞数低下割合
 図 24. A 農場 NG 乳房炎発生無治療 21 日後、分房乳体細胞数低下割合

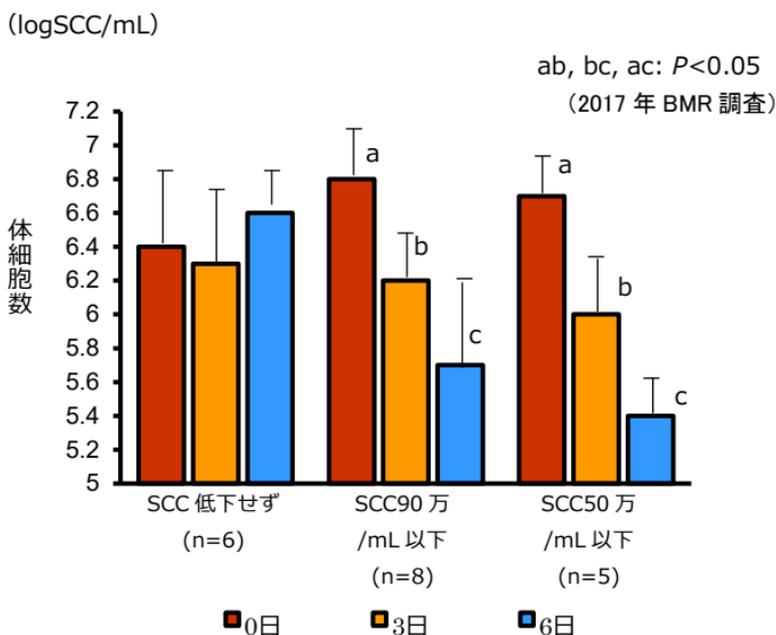


図 25. NG 乳房炎無治療における分房乳体細胞数の推移

乳房炎スコア 1 (異常乳のみ) の NG 乳房炎に抗菌剤を使用しない場合でも 6 日後で約半数 (図 23)、21 日後で約 8 割の分房で SCC の低下がみられた (図 24)。また 0、3、6 日の体細胞数は漸次減少した (図 25)。乳汁中のラクトフェリンおよび Lingual Antimicrobial Peptide (LAP) も同様の動態を示したことから、体細胞数が低下した分房では乳房内の免疫機構が良好に機能していると推察された。しかしながら、6 日では十分に体細胞数が低下していない分房も多く、乳

房炎スコア1の NG 乳房炎でも体細胞数が出荷許容なレベルまで低下するには6日以上要すると思われた。また、中には体細胞数が低下しない分房も存在するため、3日後あるいは6日以後の体細胞数検査や細菌培養検査により乳房炎の状態をモニターし、体細胞数が低下しない症例に対しては、必要に応じて抗菌剤による治療を行う必要があると考えられた。しかし、NG 乳房炎の約半数は自然治癒することが多く、少なくともその場合は抗菌剤による治療は不要といえることから、抗菌剤使用の削減の試みが求められる。

3. グラム陽性・陰性細菌における薬剤感受性成績(MIC, MBC, MBEC)

2013～2016 年にかけて全国1道5県より収集した牛臨床型乳房炎乳汁 1349 分房から得られた 530 株を分子生物学的に同定した。各菌種に対する各種抗菌剤の MIC(最小発育阻止濃度)とディスク拡散法の阻止円直径のデータを利用して、一峰性の MIC 分布を示した場合はその最低分布ラインを、また二峰性の MIC 分布を示した場合には ROC 解析を行い、感度と特異度の和が最も高い阻止円直径のラインを求めた。加えて他の国内家畜疾病の原因菌に対するブレイクポイントを参考に牛乳房炎原因菌に対する各抗菌剤の臨床的ブレイクポイントを決定した(表2)。MIC の結果からは原因菌種により薬剤耐性傾向が相違することが明らかとなった。具体的には、グラム陽性菌(*S. aureus*)は PC や PLM の感受性が高く、CEZ に耐性傾向が見られた(表5)。またグラム陰性菌(*E. coli*)は薬剤耐性が顕著であり、フルオロキノロンのみ高い感受性を示していた(表6)。

MBC(最小殺菌濃度)と MBEC(最小バイオフィーム破壊濃度)については、MIC より高値を示した。バイオフィーム形成能は原因菌種により相違し、グラム陰性菌はグラム陽性菌よりバイオフィーム形成能が高い傾向にあり、多くの原因菌株では、MIC <MBC ≒ MBEC の関係にあった。難治性乳房炎を引き起こす *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* は MIC <MBC < MBEC の関係にあった。

これらの結果から、特にグラム陰性菌の治療についてはバイオフィームを掲載する前の早期治療を念頭におき治療方法を検討する必要があると考えられた。

表 5. 乳房炎由来 *S. aureus* に対する抗菌薬の MIC, MBC, MBEC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

薬剤名	株数	MIC90	MBC90	MBEC90
PC	10	≤ 0.125	0.25	0.25
OTC	10	0.5	32	128
KM	10	1	8	8
CEZ	10	2	32	256
PLM	10	2	4	>256
ERFX	10	≤ 0.125	0.5	0.25
MBFX	10	0.25	4	1

表 6. 乳房炎由来 *E. coli* に対する抗菌薬の MIC, MBC, MBEC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

薬剤名	株数	MIC90	MBC90	MBEC90
OTC	10	128	256	>256
KM	10	4	4	4
CEZ	10	32	256	256
ERFX	10	≤ 0.125	4	16
MBFX	10	0.25	2	8

4. マイコプラズマにおける薬剤感受性成績 (MIC, MBC)

乳汁より分離された *M. bovis* について各主要薬剤に対する MIC および MBC を評価した。

MIC: *M. bovis* の各薬剤に対する MIC を表7に示した。マクロライド系抗菌剤 (TMS および TS) や KM および OTC はいずれも多くの株で耐性化していることが示された。またフルオロキノロン系抗菌剤 (CPFX, ERFX, MBFX) には、多くの株で感受性が確認されたものの、数株が 32-128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示すなど、耐性株の存在も確認された。一方、PLM に対しても 0.125-2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で推移しており、高い感受性を有することが明らかとなった。

表 7. 乳房炎由来 *M. bovis* に対する抗菌薬の MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

	range	MIC50	MIC90
TMS	4~>128	>128	>128
TS	4~>128	32	64
PLM	0.125~2	0.125	1
OTC	4~32	16	16
KM	4~128	16	32
CPFX	0.5~32	1	4
ERFX	<0.125~64	0.5	2
MBFX	<0.5~128	0.5	4

MBC: *M. bovis* の各薬剤に対する MBC を表8に示した。TMS、TS、OTC および KM に対しては、多くの株で耐性化が認められた。また、フルオロキノロン系抗菌剤(CPFX, ERFX, MBFX)には多くの株で感受性が確認されたものの、数株が 128 および >128 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を示すなど、乳房炎由来株においても耐性株の存在が確認された。PLM については、試験に供した薬剤の中で、最も高い感受性が確認された。

表 8. 乳房炎由来 *M. bovis* に対する抗菌薬の MBC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

	range	MBC50	MBC90
TMS	16~>128	>128	>128
TS	8~>128	64	>128
PLM	0.125~4	0.5	2
OTC	16~128	64	64
KM	16~>128	128	128
CPFX	1~>128	4	8
ERFX	0.5~128	2	4
MBFX	1~>128	2	4

PC: ペニシリン、OTC: オキシテトラサイクリン、KM: カナマイシン、
 GEZ: セファゾリン、PLM: ピルリマイシン、ERFX: エンロフロキサシン、
 MBFX: マルボフロキサシン、TMS: チルミコシン、TS: タイロシン、
 CPFX: シプロフロキサシン