

急性大腸菌性乳房炎治療における 抗菌剤の選択と課題

麻布大学獣医学部

篠塚康典

ACM発生状況と傾向

バルク体細胞数が低い牛群でグラム陰性桿菌が問題となる

TABLE 3. Incidence rate of clinical mastitis (cases per 365 cow-days at risk) per pathogen of 8429 cases within three bulk milk SCC (BMSCC; $\times 1000$ cells/ml) categories.¹

Pathogen	BMSCC			All herds
	≤ 150	151 to 250	251 to 400	
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	0.0279 ^{2,3}	0.0375	0.0361	0.0344
<i>Streptococcus agalactiae</i>	0.0008 ^{2,4}	0.0040	0.0059	0.0035
<i>Streptococcus uberis</i>	0.0178	0.0176	0.0197	0.0182
Other streptococci	0.0250	0.0206	0.0205	0.0218
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.0480 ^{4,5}	0.0625 ⁴	0.0827	0.0628
Coagulase-negative staphylococci	0.0182	0.0185	0.0150	0.0176
<i>Escherichia coli</i>	0.0605 ⁴	0.0520	0.0441	0.0527
<i>Corynebacterium bovis</i>	0.0146	0.0146	0.0190	0.0156
<i>Arcanobacterium pyogenes</i>	0.0018	0.0028	0.0025	0.0024
<i>Klebsiella</i> spp.	0.0054 ²	0.0028	0.0040	0.0038
<i>Pseudomonas</i> spp.	0.0032 ^{2,4}	0.0009	0.0011	0.0016
Mixed culture	0.0409 ^{4,5}	0.0503	0.0574	0.0492
Negative	0.0590 ^{2,4}	0.0362 ³	0.0261	0.0406
Contaminated	0.0129 ^{2,4}	0.0191	0.0203	0.0176
Not sampled but recorded	0.0199 ^{4,5}	0.0145 ³	0.0093	0.0149

¹If two pathogens were isolated, they were treated as a case of either pathogen.

²Different ($P < 0.05$) from herds in the medium BMSCC category (151,000 to 250,000 cells/ml).

³Tendency ($0.05 \leq P < 0.10$) for difference from herds in the high BMSCC category (251,000 to 400,000 cells/ml).

⁴Different ($P < 0.05$) from herds in the high BMSCC category (251,000 to 400,000 cells/ml).

⁵Tendency ($0.05 \leq P < 0.10$) for difference from herds in the medium BMSCC category (151,000 to 250,000 cells/ml).

バルク体細胞数が低い牛群でグラム陰性桿菌が問題となる

n=8429

菌	バルク乳体細胞数		
	15万以下	15万～25万	25万以上
SA	少	少	
CNS	差なし		
<i>Str. uberis</i>	差なし		
OS	差なし		
<i>E. coli</i>	多		
<i>Kleb. spp</i>	多		
Negative	多		

乳房炎の原因菌と重症度の割合

Table 3. Distribution of etiology of milk samples from clinical mastitis cases occurring in cows (n = 583) on Wisconsin dairy herds (n = 50) by severity score (n = 583)

Microbiological diagnosis	Severity score ¹						Total	
	Mild (1)		Moderate (2)		Severe (3)		n	%
	n	%	n	%	n	%	n	%
<u><i>Escherichia coli</i></u>	35	27.8	48	38.1	43	34.1	126	21.6
<u><i>Klebsiella</i> spp.</u>	13	30.2	16	37.2	14	32.6	43	7.4
Other gram negative ²	16	47.1	8	23.5	10	29.4	34	5.8
Environmental streptococci	39	60.9	24	37.5	1	1.6	64	11.0
CNS	25	61.0	15	36.6	1	2.4	41	7.0
<i>Staphylococcus aureus</i>	10	52.6	9	47.4	0	0.0	19	3.3
Other gram positive ³	19	52.8	15	41.7	2	5.5	36	6.2
Yeast	3	20.0	9	60.0	3	20.0	15	2.6
Mixed	24	58.6	16	39.0	1	2.4	41	7.0
<u>No growth</u>	95	57.9	55	33.6	14	8.5	164	28.1
Total	279	47.8	215	36.9	89	15.3	583	100.0

¹Mild (grade 1) when only the milk was abnormal; moderate (grade 2) when abnormal milk was accompanied by swelling or redness of mammary gland; or severe cases (grade 3) when cow exhibited systemic signs of illness such as depression, anorexia, dehydration, or fever.

²*Enterobacter* spp., gram-negative bacilli, gram-negative lactose-negative rods, *Pasteurella* spp., *Proteus* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., and *Serratia* spp. were coded as other gram negative.

³*Enterococcus* spp., *Trueperella pyogenes*, gram-positive *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., actinomycete, *Lactococcus* spp., and *Lactobacillus* spp. were coded as other gram positive.

大腸菌性乳房炎のうち、急性は およそ3分の1である

	重篤度			n=583
	軽度	中等度	重症	計
<i>E. coli</i>	27.8%	38.1%	34.1%	21.6%
<i>Kleb. spp</i>	30.2%	37.2%	32.6%	7.4%
other G(-)	47.1%	23.5%	29.4%	5.8%
no growth	57.9%	33.6%	8.5%	28.1%

軽度 : 異常乳のみ

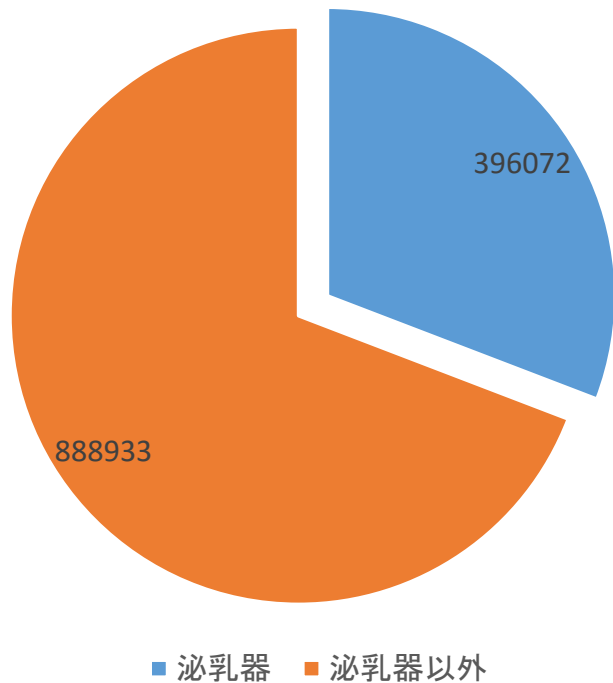
中等度 : 異常乳 + 局所症状

重度 : 異常乳 + 局所症状 + 全身症状

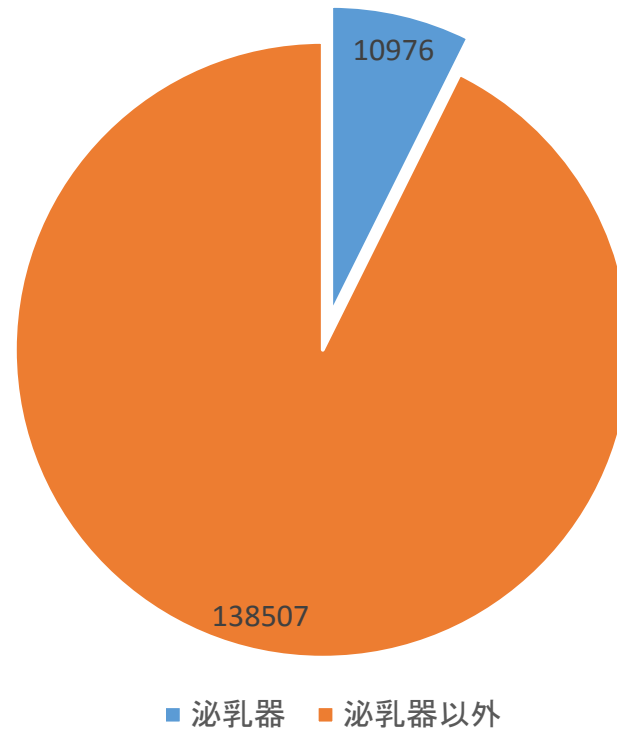
泌乳器による病傷・死廃事故件数 (家畜共済統計26年度)

引き受け頭数 2174162頭
全体死廃頭数 149483頭(6.9%)

病傷



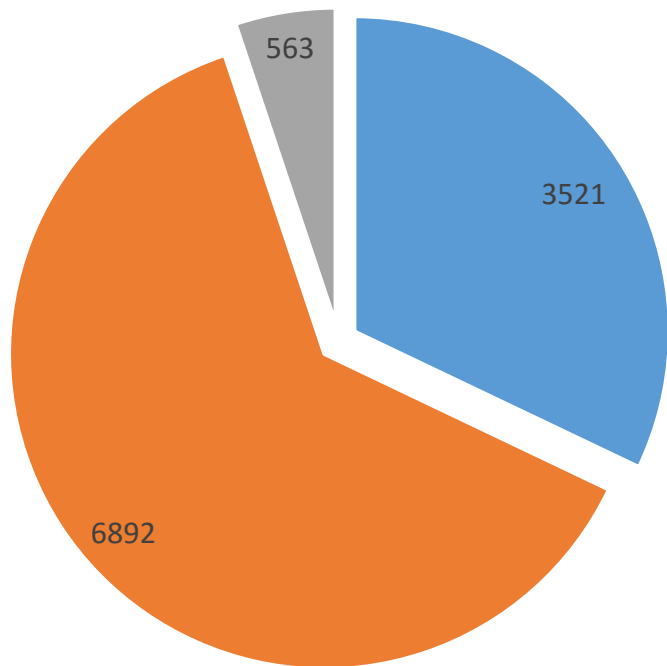
死廃



泌乳器による年間死廃頭数は10976頭で死亡廃用事故全体の7.3%を占める

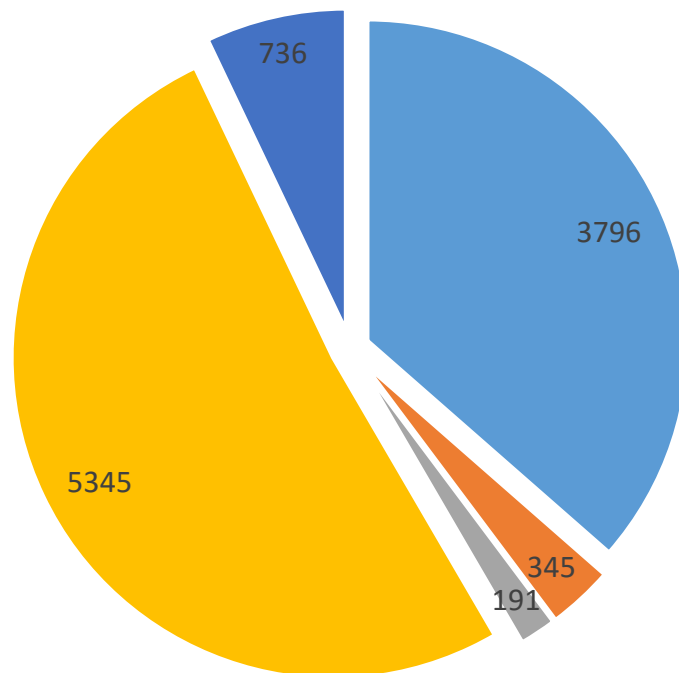
泌乳器による死廃事故内訳 (家畜共済統計26年度)

泌乳器による死廃頭数 10976頭



■ 甚急性 ■ 急性 ■ その他

甚急性・急性乳房炎の原因菌



■ 大腸菌 ■ 黄色ブドウ球菌 ■ 連鎖球菌 ■ その他 ■ PAなど

泌乳器による死廃はほとんどが急性・甚急性乳房炎で
その原因菌は大腸菌によるものが多い

急性大腸菌性乳房炎の損害は大きい

- 急性大腸菌性乳房炎 (Acute Coliform Mastitis: ACM)・・・グラム陰性桿菌による乳房炎
- 致死率高い、泌乳能力低下による淘汰率高い
- 有害な治療をやめる
- より効果のある治療を行う



目的:出荷できる乳量を確保し、長期生存

ACMの診断

急性大腸菌性乳房炎の特徴

- 進行が速い

- 初診時の病態ステージはさまざま

- 感染成立からはそれなりの時間を要するので早期発見は可能

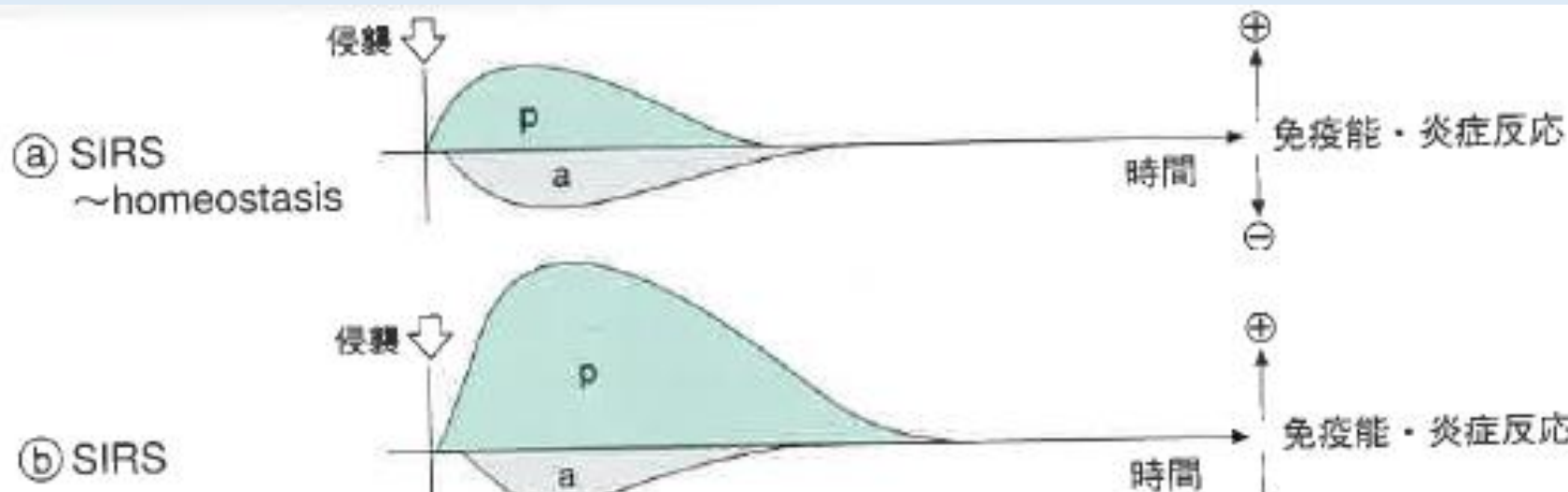
- 発病病理が異なる

- 病態ステージによって治療方針が異なる

- 大腸菌とクレブシエラの病原性の違い

ACMは他の乳房炎と発病病理が違う

- 炎症・・・刺激に対して免疫応答が働き、そのことによって生体に出現した反応
- グラム陰性桿菌の細胞壁構成成分であるLPSは強い免疫刺激
- 全身性炎症反応症候群(systemic inflammatory response syndrome: SIRS)



獣医師に求められるACM診断

- エンドトキシン乳房炎か否かの早期診断
- 病態ステージ
- 大腸菌かクレブシエラか

なぜ早期診断が必要か

- 菌の増殖が速い
- 病態の進展が速い
- 早期診断・早期治療の効果が大きい
- 重症になってからではだれでもわかる
 - フリー(乳量で判断)よりつなぎ(食欲で判断)の方が発見しやすい

どうやって早期診断するか

他の乳房炎と区別するために現場でできること

- 第一胃運動をみる
- 全身性炎症反応症候群 (SIRS) 所見
- 診断感度をあげる
 - 疫学的 (気候・発生状況・敷料・牛群の状態など)
 - 見逃すと重大な結果をまねくという意識
- 他の分房の乳量
- 研究中
 - 他分房のpHをみる
 - 乳汁中のエンドトキシンをみる (酪農大・鈴木先生)



第一胃運動を指標とした診断法

- 甚急性乳房炎53頭・・・(G(-)36頭、その他17頭)

- WBC, RBC, Ht, PLT 大下ら(2008)
- BUN, T-Bil, iP, Ca, GOT, GGT
- BT, 硬結(あり・なし)、乳汁(透明・白色)
- **第一胃運動**

区分	LV1	LV2	LV3	LV4
G(-)	3 (48.9%)	16 (34.0%)	8 (17.0%)	0
その他	0	14 (56.0%)	11 (44.0%)	0

60秒聴診

- LV1: 第一胃運動停止または5秒未満の断片的な蠕動運動聴取
- LV2: 収縮力は弱いですが5秒以上の持続的な蠕動を聴取
- LV3: 収縮力は中程度で持続的な蠕動運動を聴取
- LV4: 力強い収縮と連続した蠕動を聴取

全身性炎症反応症候群の 診断基準

項目	
体温	$<38^{\circ}\text{C}$ または $40^{\circ}\text{C}<$
脈拍	90/min以上
呼吸数	20/min以上
WBC(mm^3)	<4000 または $12000<$

SIRSの診断基準
(少なくとも2項目を満たした場合)

現場での診断基準はシンプルの方が良い

診断感度をあげる

- 感度と特異度
 - 感度・・・ACM牛を陽性と判定する割合
 - 特異度・・・非ACM牛を陰性と判定する割合
- ACM牛は陽性、非ACM牛は陰性と診断できればよいですが.....
- 誤診には2種類・・・見逃しと無実の罪

ACMの診断は誤診のリスク込で

- 誤診は二種類（無実の罪と見逃し）
- 感度（sensitivity）と特異度（specificity）
 - 感度・・・ACM牛を陽性と診断する割合
 - 特異度・・・非ACM牛を陰性と診断する割合



獣医師の考える誤診と 農家の思う誤診は異なる

獣医師の誤診・・・病名を間違えたとき
農家の誤診・・・牛が治らなかったとき

真の病名	獣医師の診断・治療	治療結果	獣医師の立場	農家の立場
ACM	ACM	良	正診	
	ACM以外	悪	誤診	誤診
ACM以外	ACM	良	誤診	
	ACM以外	良	正診	

ACMは見逃すと致命的・・・よい誤診をしよう
感度100%とは陰性に意味がある

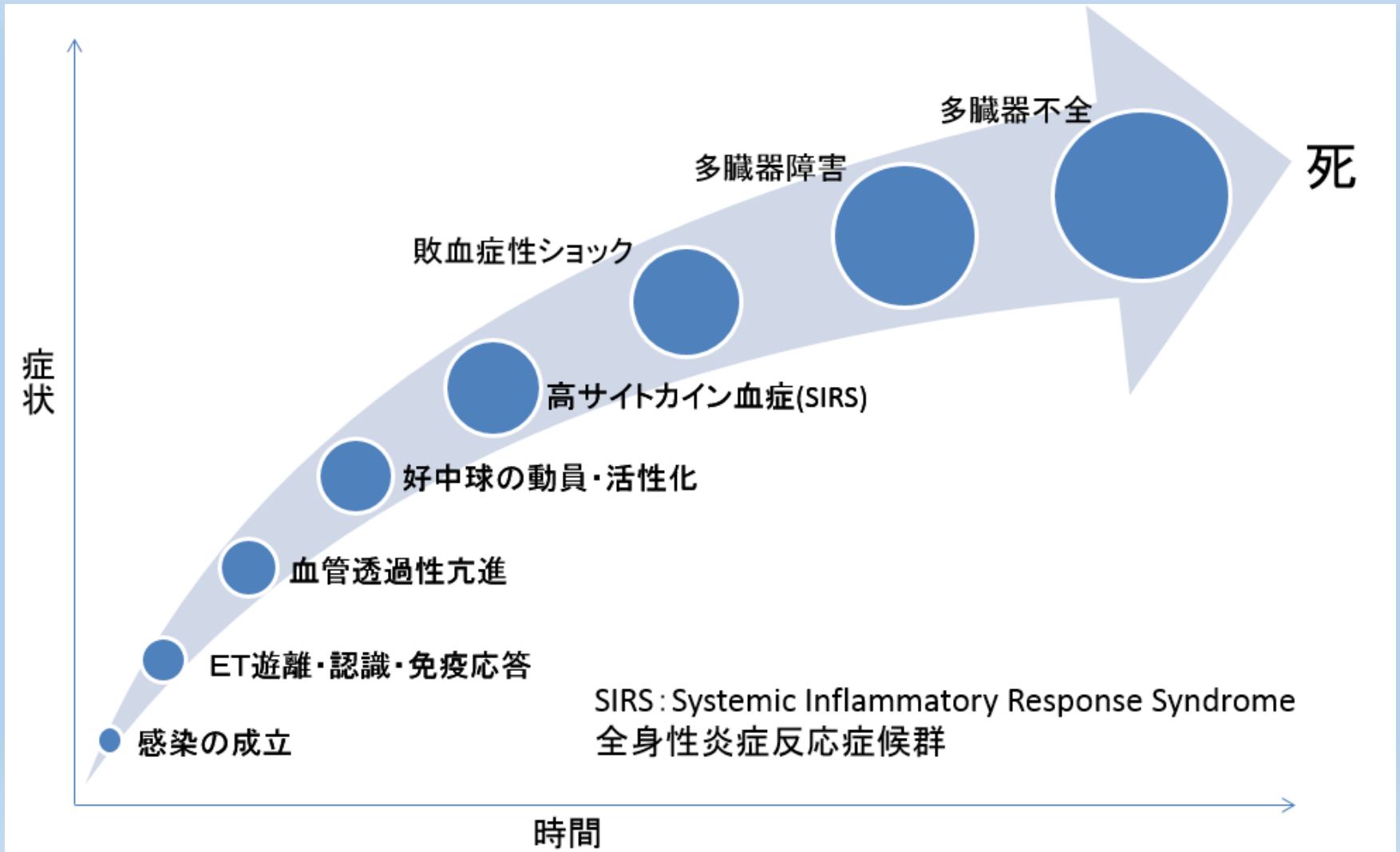
目的: 当てることではなく見逃さないこと

なぜ病態ステージを評価するか

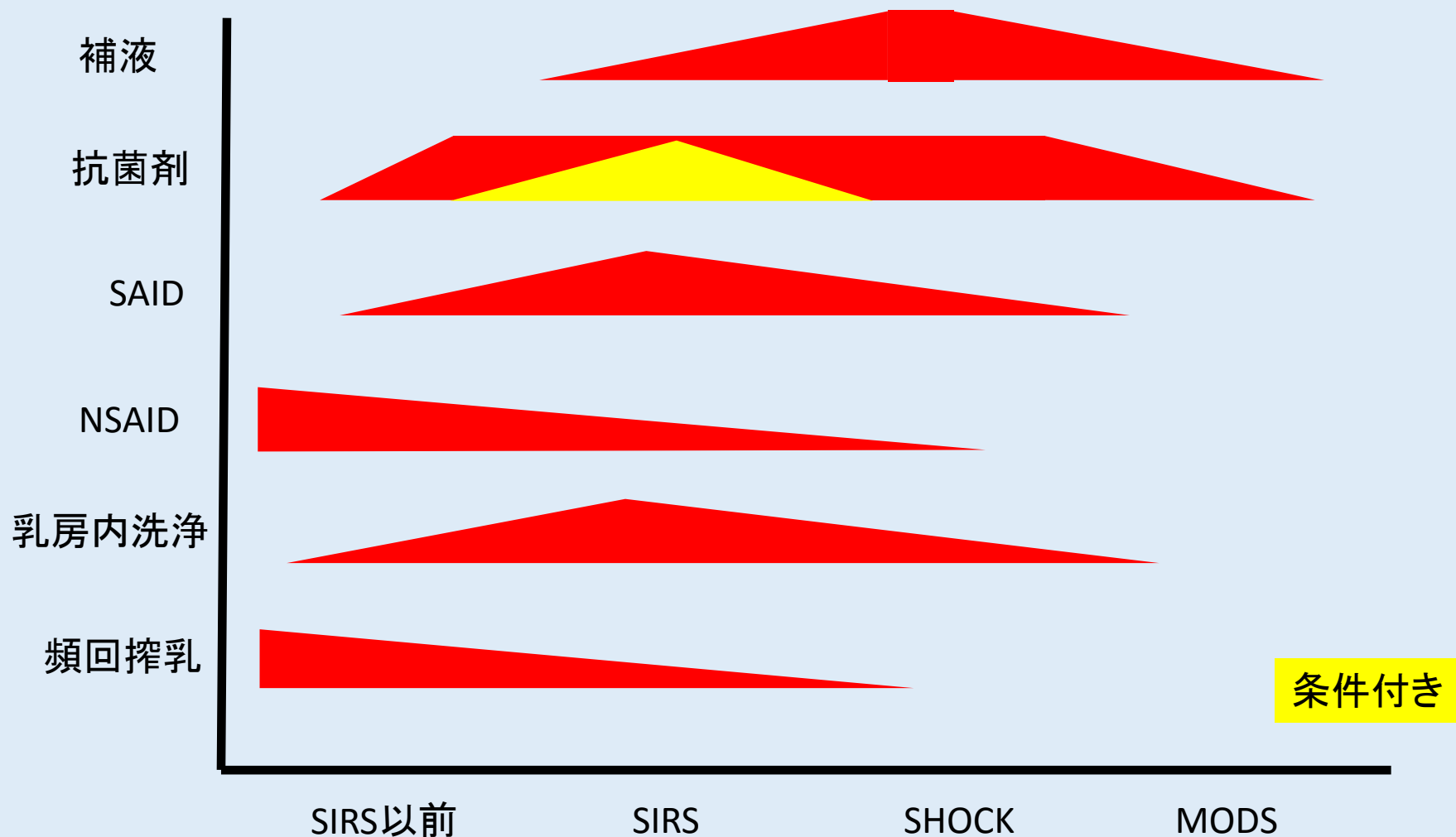
- 病態ステージによって治療方針が異なるから
 - SIRS(全身性炎症反応症候群)以前
 - SIRS
 - SHOCK・・・warm/cold
 - MODS(多臓器障害)



ACMにおける病態ステージの進展



病態ステージと治療効果（私見）



病態ステージごとの各種パラメータの動き

現場でわかること

病態	T	P	R	眼結膜	皮温	耳端	起立	下痢	血糖値
SIRS	↑	↑	↑		↑		可能	無	
Warm Shock	↑	↑	↑	充血	↑		不安定		↓
Cold Shock	↓			充出血	↓	↓	不能	有	↓

後でわかること

病態	WBC	Ca	Ht	BUN	PLT	心拍出	末梢血管
SIRS	↓	↓				↑	
Warm Shock	↓	↓	↑		↓	↑	↑
Cold Shock		↓	↑	↑	↓	↓	↓

予後は心拍数 116 Ca 8 Ht 37 BUN 19 を目安としている (NOSAI愛媛 久枝先生)

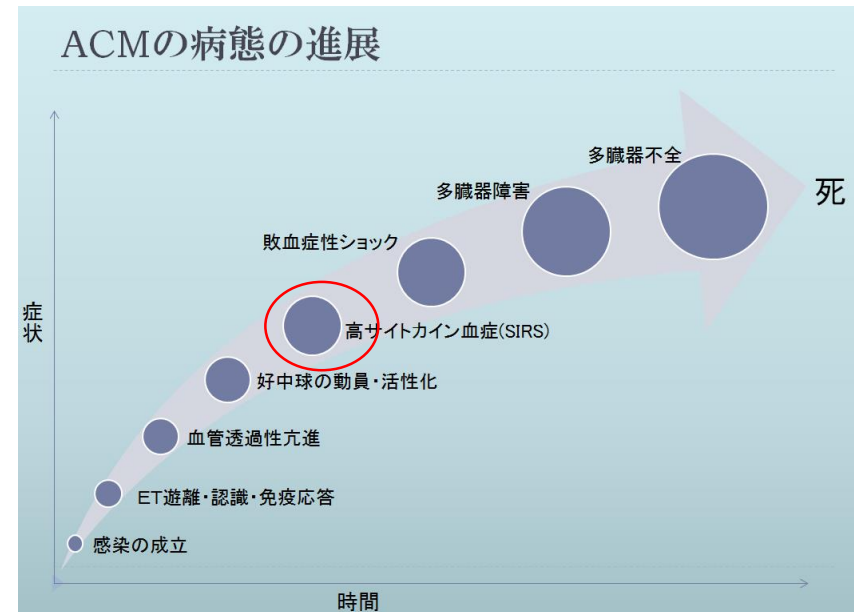
SIRSとはどういう状態か

- 高サイトカイン血症
- 臓器不全発症の準備状態
- 感染・ショックなどを合併すると、それがsecond attackとなって臓器不全を発症する危険がある
- SIRS状態が持続するほど合併症の危険が大きい
- できるだけ早くSIRS状態を脱する必要がある

SIRSの診断基準

項目	
体温	<38または40<
脈拍	90/min以上
呼吸数	20/min以上
WBC	<4000または12000<

(少なくとも2項目を満たした場合)



現場で応用できる判断基準

全身症状

Variable	Criteria	Score
Rectal temperature (°C [°F])	37.8 (100)–39.27 (102.7)	0
	39.33 (102.8)–39.8 (103.7)	1
	> 39.8 (103.7) or < 37.8 (100)	2
Hydration status (degree of enophthalmos)	None	0
	Mild	1
	Moderate	2
	Marked	3
Rumen contraction rate (contractions/min)	≥ 2	0
	1	1
	0	2
Attitude (signs of depression)	None	0
	Mild	1
	Marked	2
	Cows with total score of 0 to 2 were classified as having mild disease, cows with total score of 3 to 5 were classified as having moderate disease, and cows with total score of 6 to 9 were classified as having severe disease. Reproduced with permission.	

局所症状

Variable	Criteria	Score
Quarter firmness	None	0
	Firm	1
	Very Firm	2
Quarter swelling	None	0
	1.5 times	1
	2 times	2
Signs of quarter pain	None	0
	Present	1
Secretion characteristics	Normal	0
	Thin with clots or flakes	1
	Serum-like with clots or flakes	2
Cows with total score of 0 to 2 were classified as having mild disease, cows with total score of 3 or 4 were classified as having moderate disease, and cows with total score of 5 to 7 were classified as having severe disease.		

Wenzら (2006)

結論: 全身症状で判断する方が有用である

現場で応用できる判断基準

全身症状	基準	点数
体温	37.8-39.2	0
	39.3-39.8	1
	<37.8 or 39.8<	2
脱水	なし	0
	軽度	1
	中等度	2
	重度	3
第一胃運動(分)	≥2	0
	1	1
	0	2
沈うつ度	なし	0
	軽度	1
	重度	2

合計点	重症度
0-2	軽度
3-5	中等度
6-9	重度

Wenzら (2006)

私の経験上
 中等度はSIRS
 重度はSHOCK
 が多いです

敗血症性ショックの診断

・ショックの定義

- ・ 生体が必要とするよりも心拍出量が少ない場合、そしてそれを補正しないと死に至る重症なもの

病態	T	P	R	眼結膜	皮温	耳端	起立	下痢	血糖値
SIRS	↑	↑	↑		↑		可能	無	
Warm Shock	↑	↑	↑	充血	↑		不安定		↓
Cold Shock	↓			充血	↓	↓	不能	有	↓



敗血症性ショックの特徴

- 血管拡張・血管透過性亢進・血管内皮細胞障害・好中球や凝固系活性化
- 血管容積↑、血管内容量↓のダブルパンチ
- エンドトキシンショックは「血液分布異常性ショック」と「血液量減少性ショック」に該当

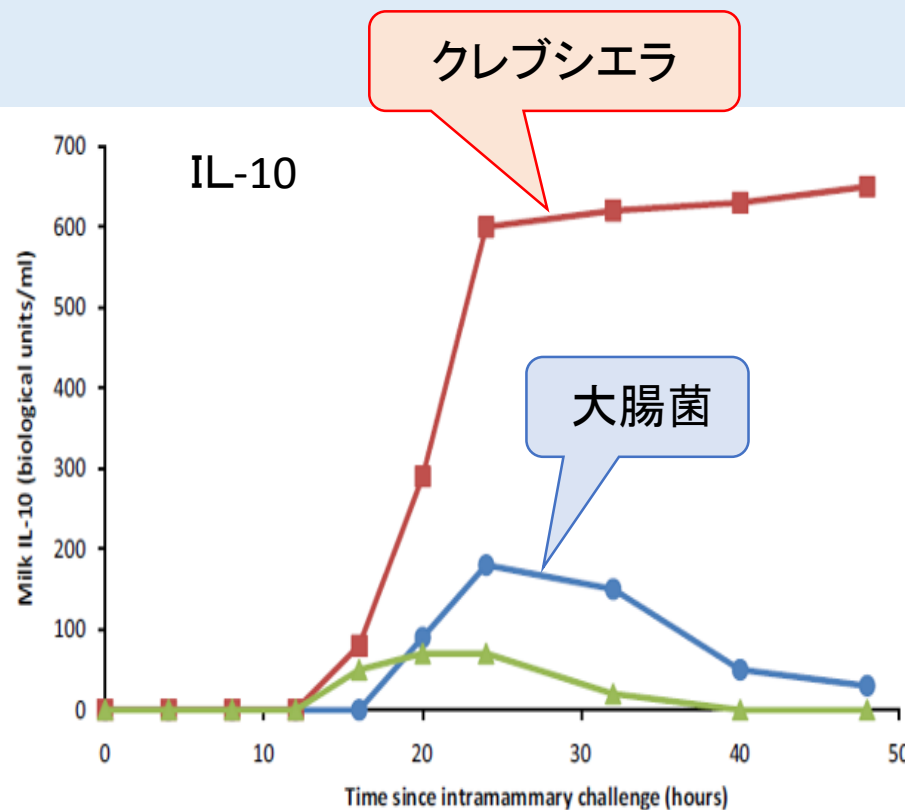
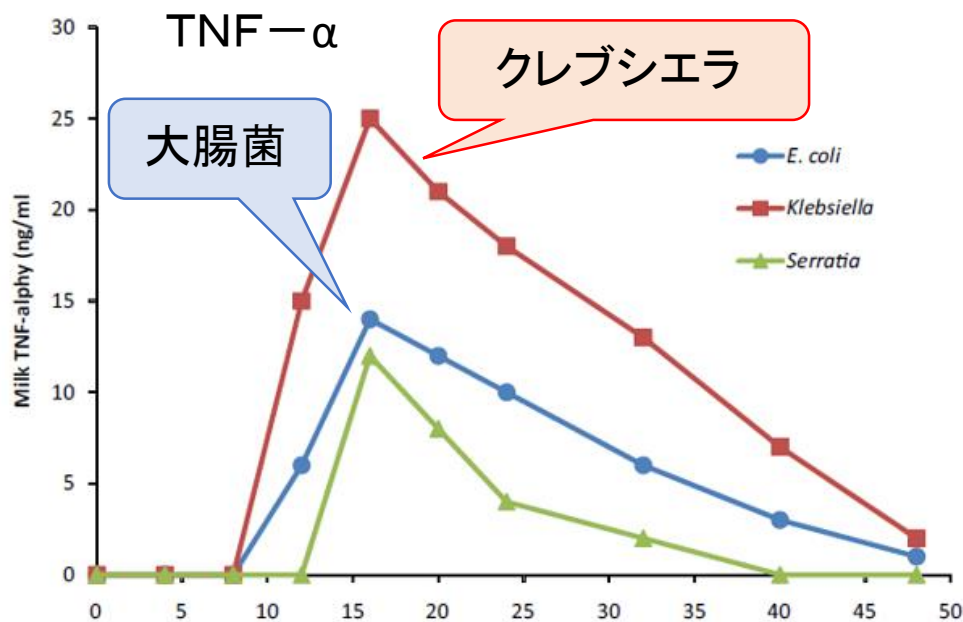


生体代償反応が期待できない

クレブか大腸菌かを診断する

- なぜ必要か
 - 病原性が異なり、予後が異なるから
- 治療法が異なる
 - クレブシエラは大腸菌よりも乳房内感染が長く持続
(Smithら1985)
- クレブシエラによるACMの最善の治療はわかっていない
- 予後を農家に説明する重大な根拠となる

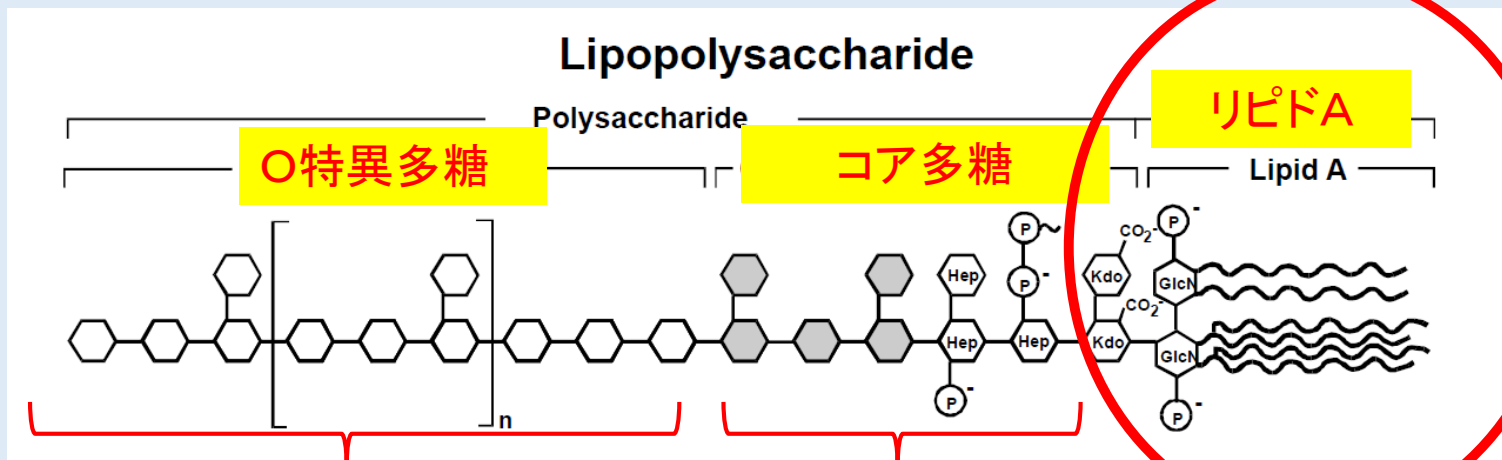
菌種別サイトカイン誘導性



クレブシエラのほうがサイトカイン誘導が強い

クレブシエラの特徴

- 莢膜の存在と生体への影響
 - マクロファージや白血球の貪食を回避し、増殖しやすい
 - 侵入性？
- LPSの構造(リポドA アシル基数)
 - サイトカイン誘導性が強い



クレブシエラの病原性

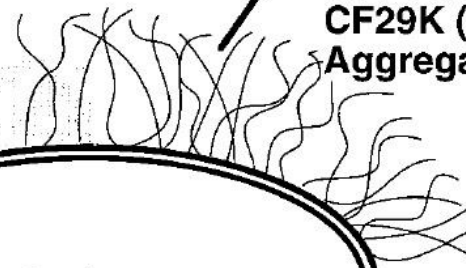
血清耐性

Serum resistance

接着能

Adhesins

Type 1 pili (MSHA)
Type 3 pili (MR/K-HA)
KPF-28 fimbriae
CF29K (nonfimbrial)
Aggregative adhesin



エンドトキシン

LPS
(8 serotypes)

cytoplasm

Enterochelin
Aerobactin

莢膜

Capsule
(77 serotypes)

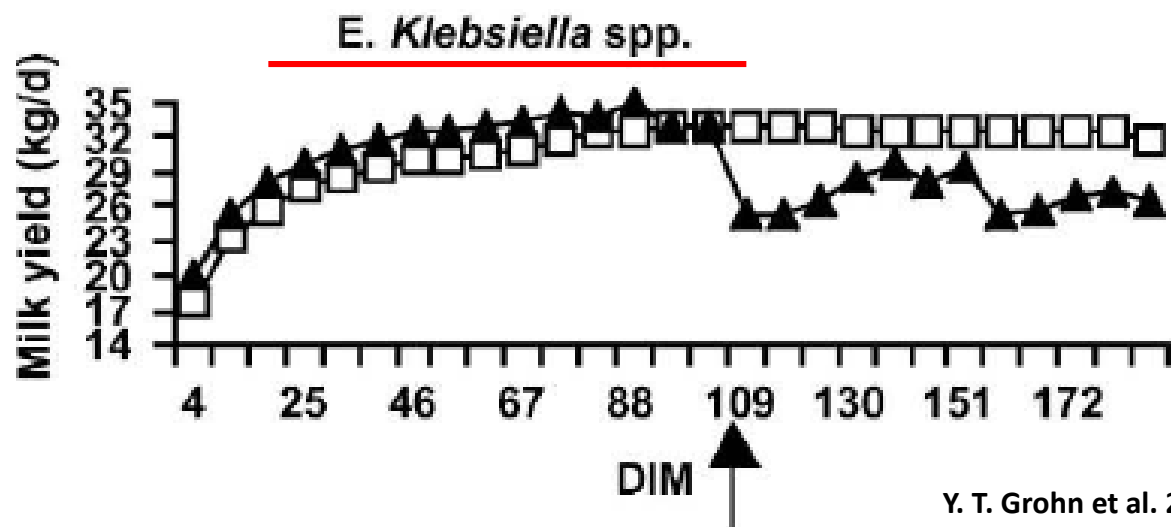
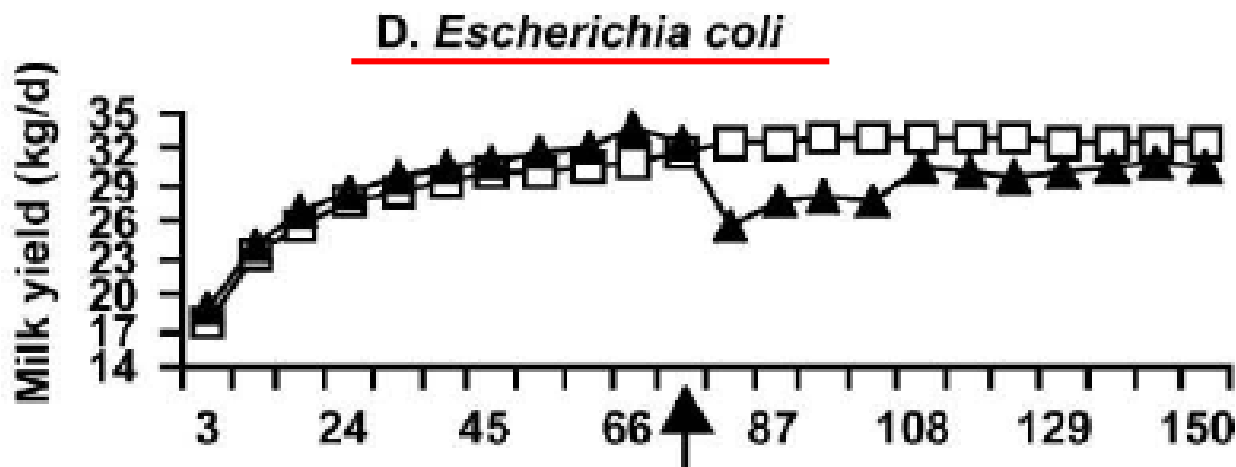
Siderophores



FIG. 1. Schematic representation of *Klebsiella* pathogenicity factors.

鉄取り込み能

大腸菌とクレブシエラの予後(乳量)の違い



クレブは乳量が減る

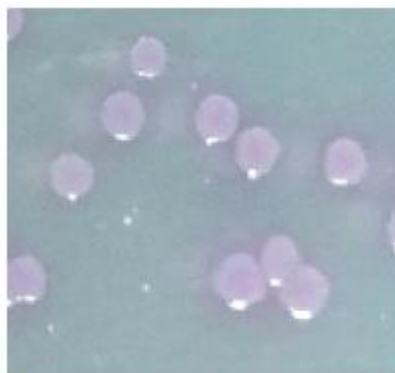
クレブか大腸菌かを診断する方法

- 治療前乳汁採取
- 飼養環境観察・乳房炎発生疫学から想像

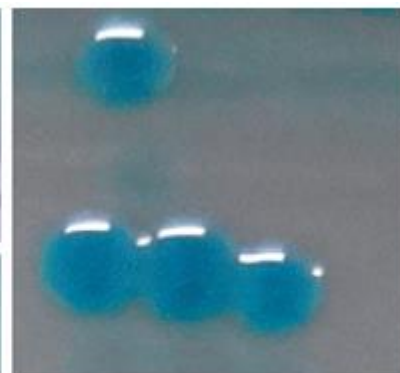
診療所に帰って

- 乳汁培養（血液寒天培地・選択培地など、菌数）
- KOH法
- コロニー観察（S型・R型、大きさ、色、ツヤ、形状）
- 染色（グラム染色・莢膜染色など）

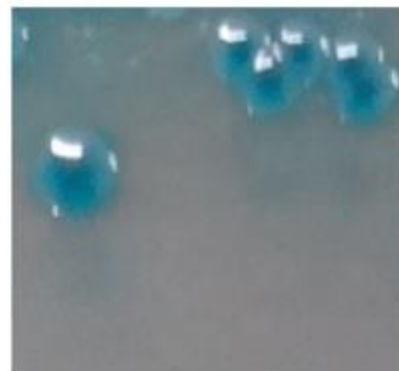
血液寒天・クロモアガーオリエンタシオン培地



Escherichia coli



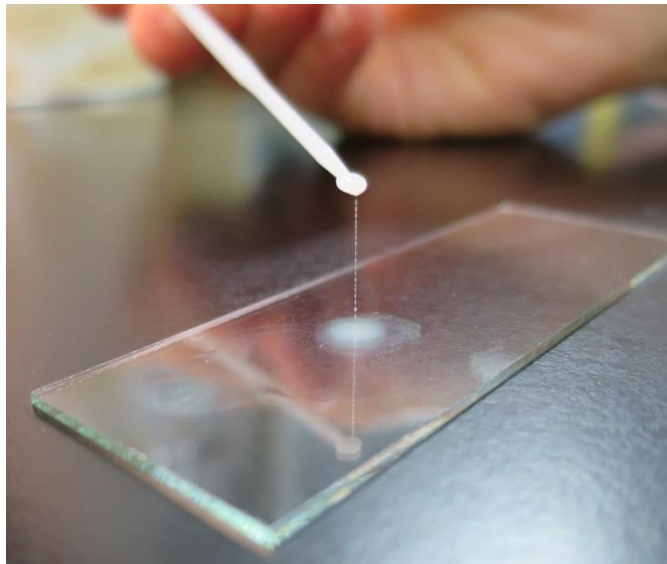
Klebsiella pneumoniae



Enterobacter cloacae

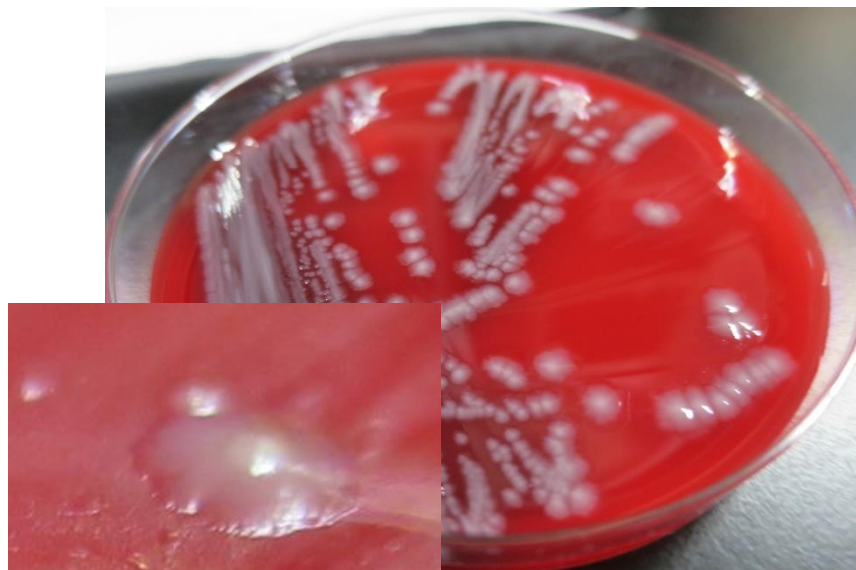
糸引き試験

- 劉氏法
- スライドグラス上で3%KOHと被検菌を混和し糸を引けばグラム陰性菌

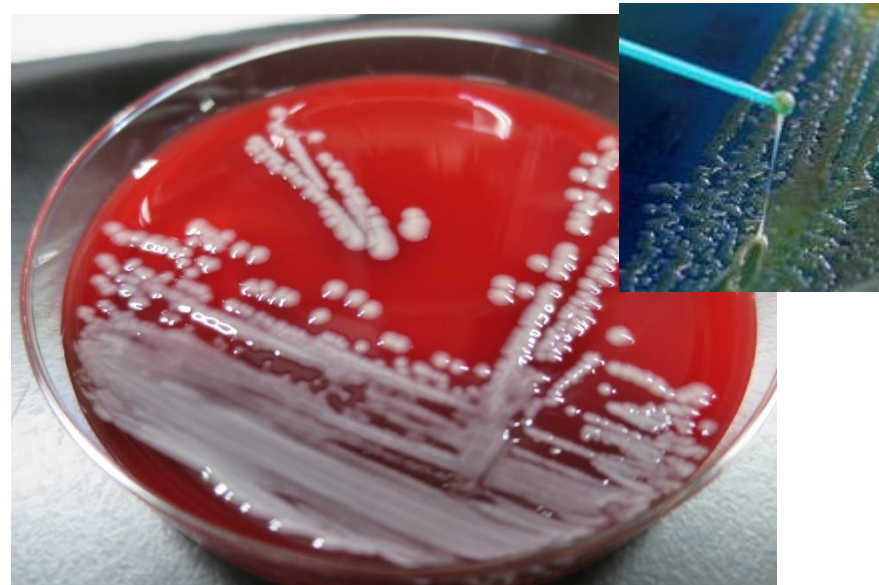


血液寒天培地での見分け方

大腸菌

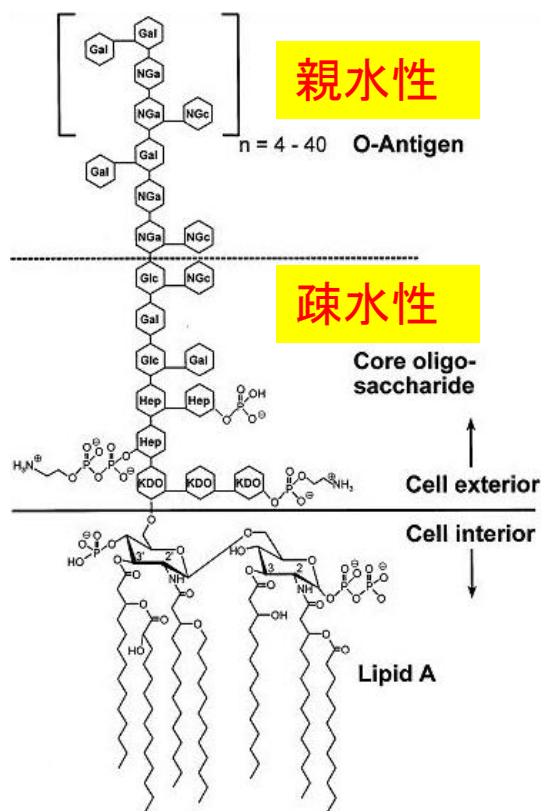


クレブシエラ



		大腸菌	クレブシエラ
コロニー	大きさ	大	大
	色	灰色	乳白色・つやあり
	形状	R:ラフ(ギザギザ)が多い 不整形	S:スムーズ(つるつる) ムコイド状
におい		特有の臭気	

コロニー形状（スムーズ型とラフ型）



エンドキシンの構造

		大腸菌	クレブシエラ
コロニー	大きさ	大	大
	色	灰色	乳白色・つやあり
	形状	R:ラフ (ギザギザ)が多い	S:スムーズ (つるつる)
におい		不整形	ムコイド状
		特有の臭気	

K抗原(親水性)を持つ・・・smooth

K抗原をもたない・・・rough

O抗原(親水性)を持つ・・・smooth

O抗原をもたない・・・rough

Galanosら (1984)

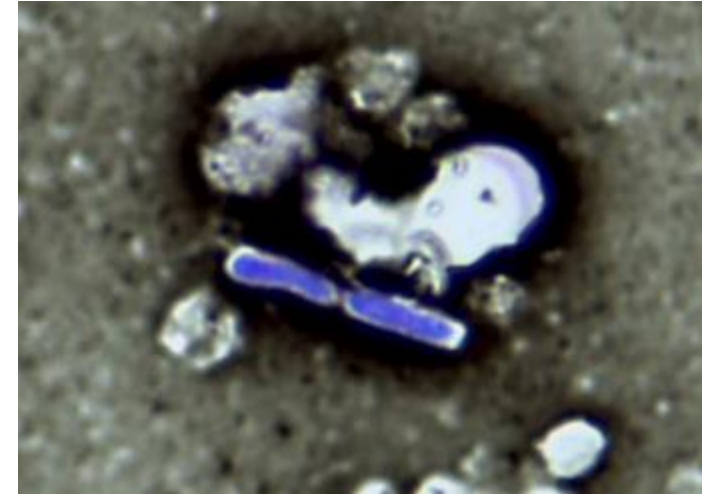
スムーズ型の方が臨床症状は強い

→O抗原よりK抗原の方が病原性が強いということ?

莢膜の存在を確認しよう

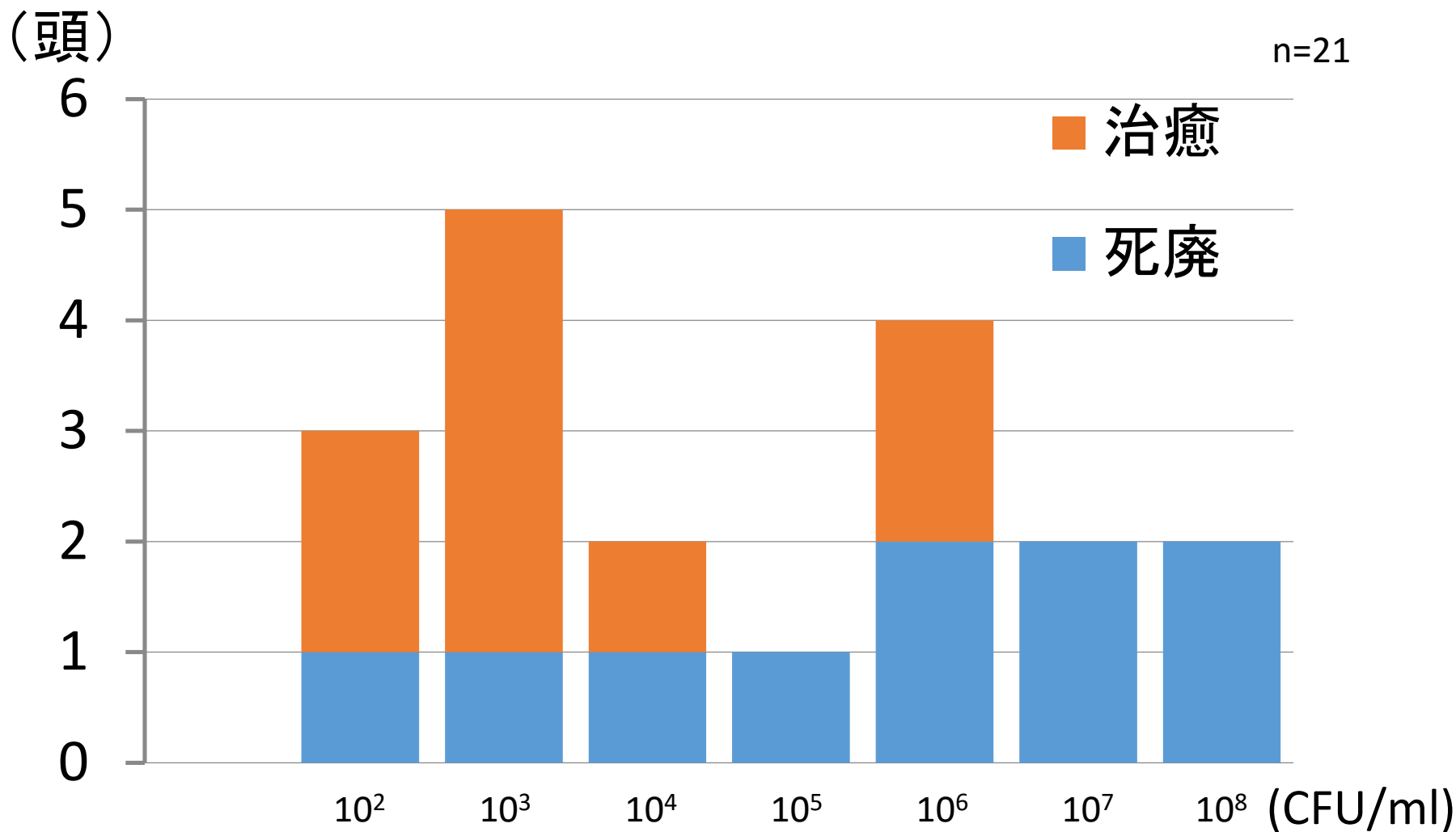
- 莢膜染色・・・墨汁染色（negative染色）、Hiss染色
- 莢膜二重染色（簡易ギムザと墨汁染色）

菌体と背景を染めるので莢膜が白く抜けて見える



1. 検体乳汁をスライドグラス中央に塗布
2. 風乾後、簡易ギムザ染色（ディフクイック）
3. 水洗・風乾後、墨汁をスライドグラスの端に滴下し、血液塗抹をひく要領で塗抹
4. 水洗せず風乾後観察
（NOSAIえひめ 杉山先生の手順）

初診時乳汁中生菌数と予後



注: 潜在性の場合には採材後の経過時間と菌量は負の相関との報告あり

ACMの診断 まとめ

診断すべき項目	実践	
	現場	診療所
LPS乳房炎か否か	胃運動 感度をあげる	乳汁培養 半日後に再診
病態ステージ	臨床観察 血糖値	血液検査 Ca, Ht, BUN, PLT
クレブシエラか大腸菌か	環境観察 疫学	乳汁培養 莢膜染色

原因菌の同定や各種血液検査は自分の現地診断の答え合わせに必要です

ACMの治療

大腸菌性乳房炎治療の世界的指針

*E.coli*の場合

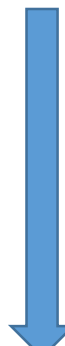
症状		異常乳のみ	局所症状のみ	全身症状		
分類		mild	moderate	severe		
				mild	moderate	severe
治療	全身	非推奨	非推奨	FQ、第ⅢまたはⅣ世代セファロスポリン		
	局所	非推奨	非推奨	非推奨		

Treatment for bovine Escherichia coli mastitis-
an evidence based approach L. Suojala (2013)

系統	成分名	商品名
Fluoroquinolone	Enrofloxacin	バイトリル
3 rd cephalosporin	Ceftiofur	エクセネル
4 th cephalosporin	Cefquinome	セファガード・コバクタン

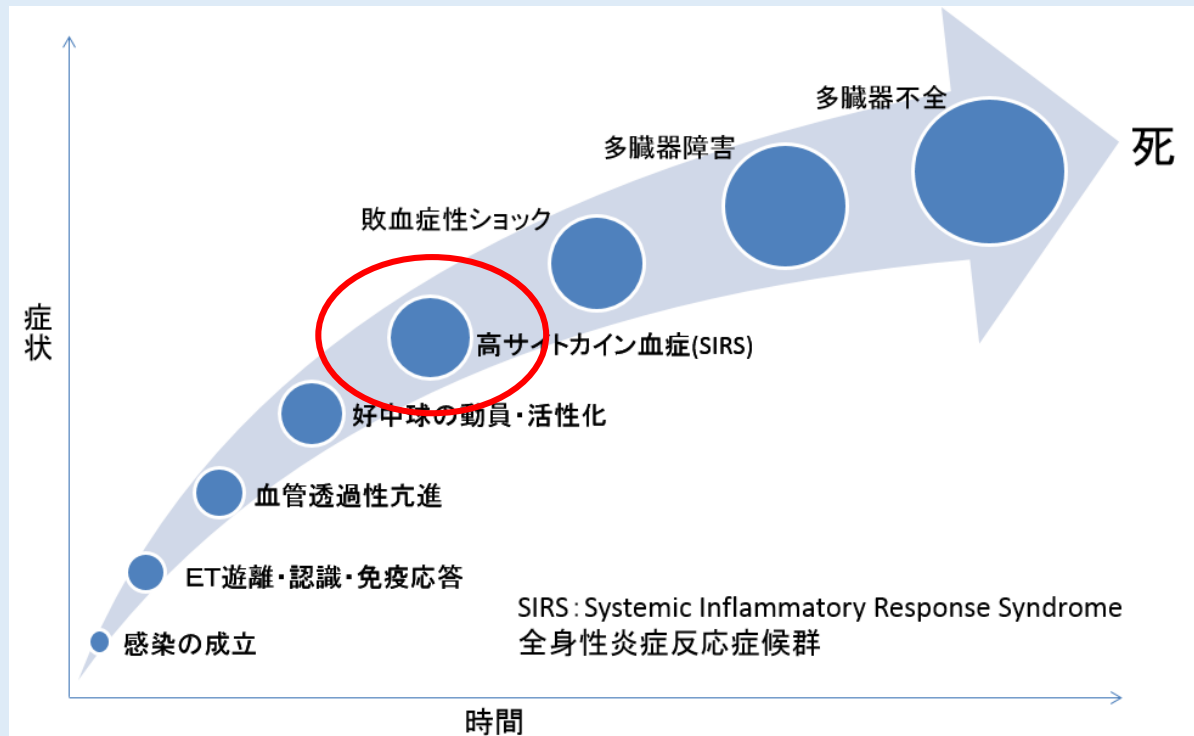
ACMの治療

- 病態ステージに応じた治療が重要

- 
- SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome)
全身性炎症反応症候群
 - SHOCK (Warm Shock)
 - SHOCK (Cold Shock)
 - MODS (Multiple Organ Dysfunction Syndrome)
- 大腸菌かクレブシエラかで方針が異なる
 - 抗菌剤の投与期間

病態ステージと治療方法

- 局所感染の存在するSIRS
- ショックへの移行例 (warm shock)
- ショックへの移行例 (cold shock)



治療：「局所感染の存在するSIRS」

I) SIRSからの脱却

→侵襲原因除去

→生体恒常性に期待(攪乱させない)

II) SIRSの原因となっているLPSコントロール

→物理的除去

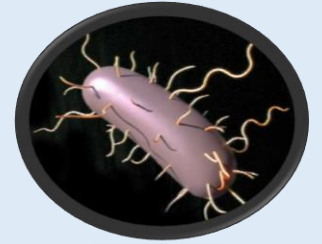
→貪食細胞による処理

III) LPSの原因となっている菌コントロール

→抗菌剤

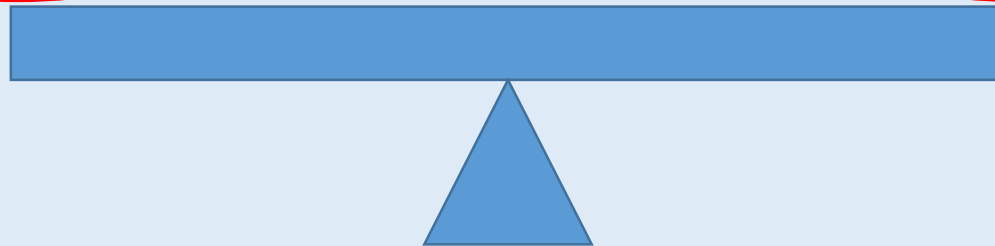
局所感染の存在するSIRSの治療ジレンマ

- グラム陰性桿菌の感染による乳房炎である
- 強い炎症反応の主役はLPSである
- 抗菌剤の投与は菌を崩壊させる
- LPSは菌体の崩壊とともに放出される



感染制御

炎症制御



ヒトにおける 医原性エンドトキシンに関する研究

- In vitro
 - 放出LPSは抗菌剤の作用部位による (PBP)
 - 放出LPSは低濃度ほど多い (緑膿菌)・・・作用点濃度依存
 - 感受性株より非感受性株が多い
- In vivo
 - LPS放出は生体にとって悪影響との報告が多い (LPS濃度で評価、その後誘導されるサイトカインでも同様の評価)



放出LPSによる生体への影響を認める結果

ウシにおける 医原性エンドトキシンに関する研究

- In vitro
 - 大動物領域で用いられる抗菌剤は同様のLPS放出であったがオゾンによる殺菌では少なかった(2008)
- In vivo
 - 大腸菌モデルに対するエンロフロキサシン投与は血中LPS濃度に影響しなかった(Dosogneら2002)
 - 大腸菌モデルに対するエンロフロキサシン投与は血中TNF α やNOに影響しなかった(Blumら2000)
 - で評価、その後誘導されるサイトカインでも同様の評価)



放出LPSによる生体への影響が考えられる

牛でも医原性LPSの生体への影響は大きい

医原性LPS: 抗菌剤の投与により人為的に放出されたLPS

- 临床上どれくらいの影響があるかが重要
- どうやって証明するか (臨床例56頭)

治療法	Odds比	95%信頼区間	P
抗生物質の非全身投与	5.7	1.4-23.1	0.015
局所でのステロイド使用	5.4	1.6-18.3	0.006
乳房内洗浄	3.0	0.8-11.2	0.125



原因菌制御よりも炎症制御が優先される時期が存在

医原性LPSは相加的か相乗的か

- シュワルツマン反応

- 腸チフス菌の培養ろ液(内毒素)をウサギの皮内に注射(準備注射)し、24時間後に同じろ液(内毒素)を静脈注射(惹起注射)すると数時間以内に局所が出血・壊死する反応
- 準備注射を全身にしておくと全身性シュワルツマン反応をおこし24時間以内に死亡する

- セカンドアタックセオリー

- First attackでprimingされ易刺激性の炎症細胞が重要臓器へ集積した状態で新たな侵襲(second attack)によるサイトカイン再誘導によってpriming好中球を刺激し重要臓器を攻撃するという理論

相乗的となる可能性が十分に考えられるが
ウシでは証明されていない

では、どうやって治療するか

医原性LPSを考慮した治療をすればよい
(しなければならない)

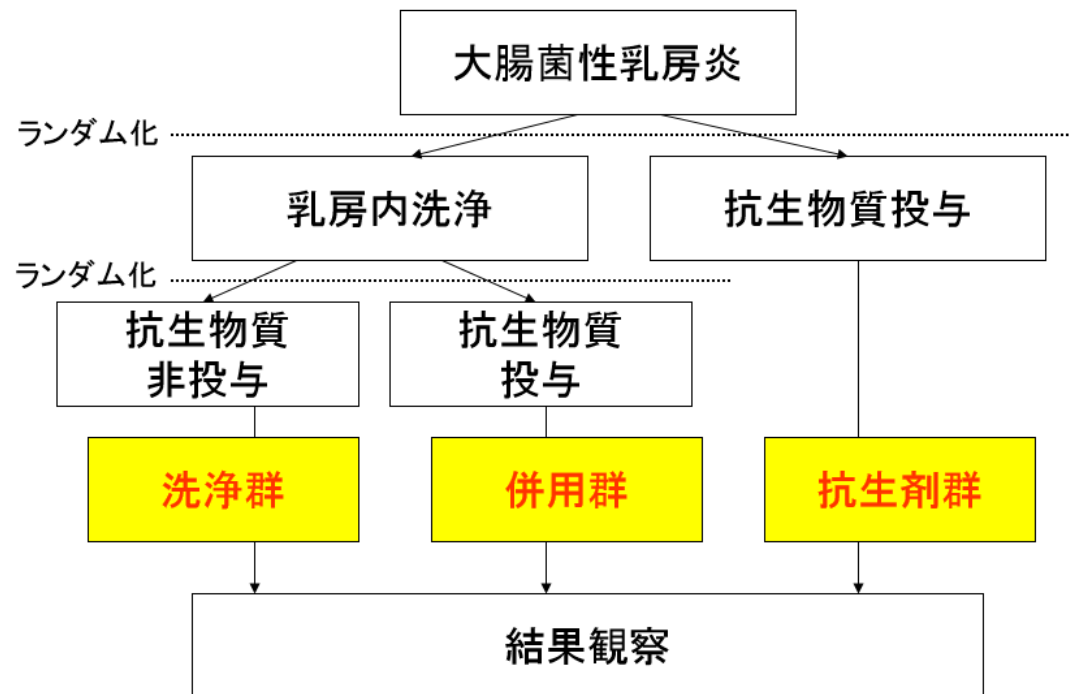
1. 抗菌剤投与前に物理的に菌の絶対数を減らす
2. 理論的に抗菌剤を選択する
3. 医原性LPSに対する生体反応を抑制する

抗菌剤投与前に物理的に菌の絶対数を減らす

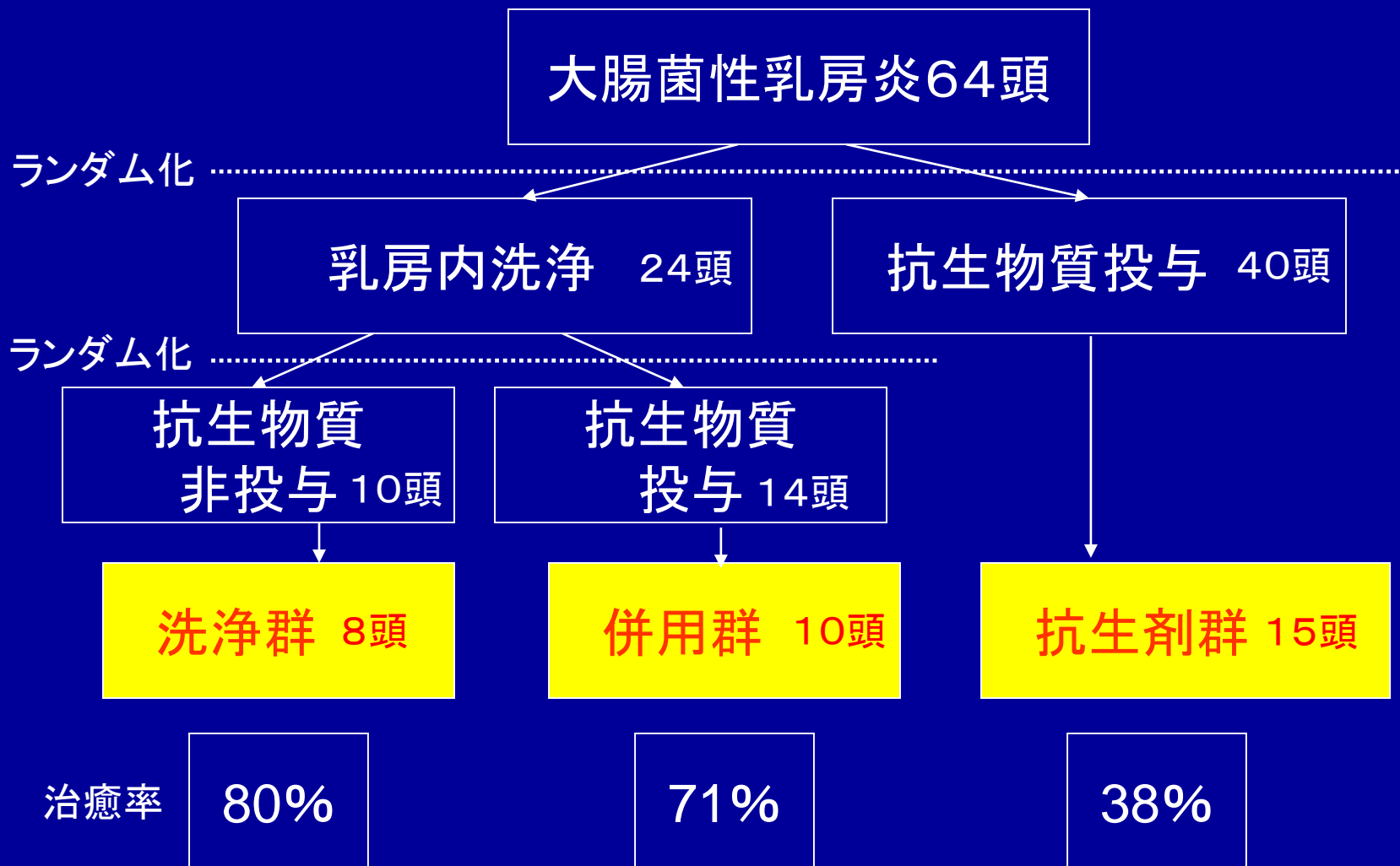
- 頻回搾乳・・・そんなに搾れない(特に硬結してる場合)
- オキシトシン・・・補液の一本目に入れると効果的
- 乳房内洗浄・・・強制的な物理的排除

乳房内洗浄療法の効果

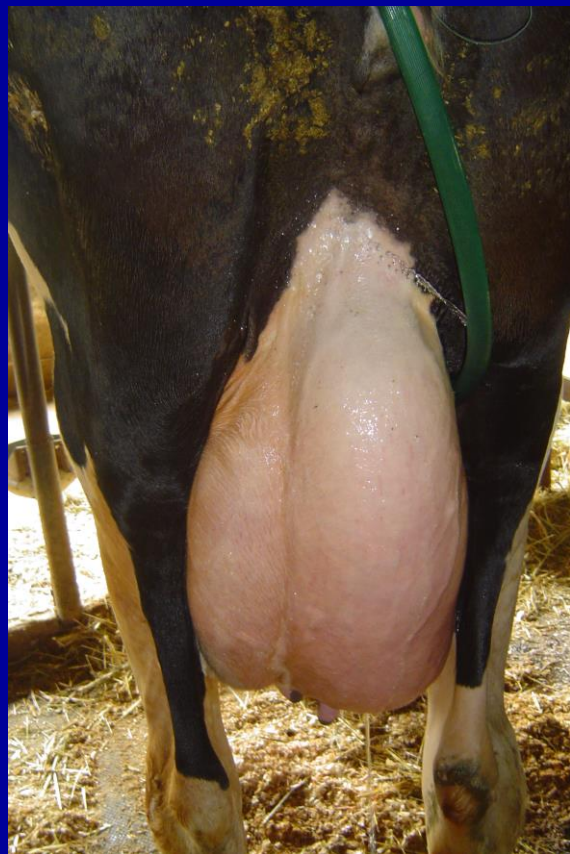
- 急性大腸菌性乳房炎牛64頭を対象にランダム化臨床試験



ACMランダム化臨床試験

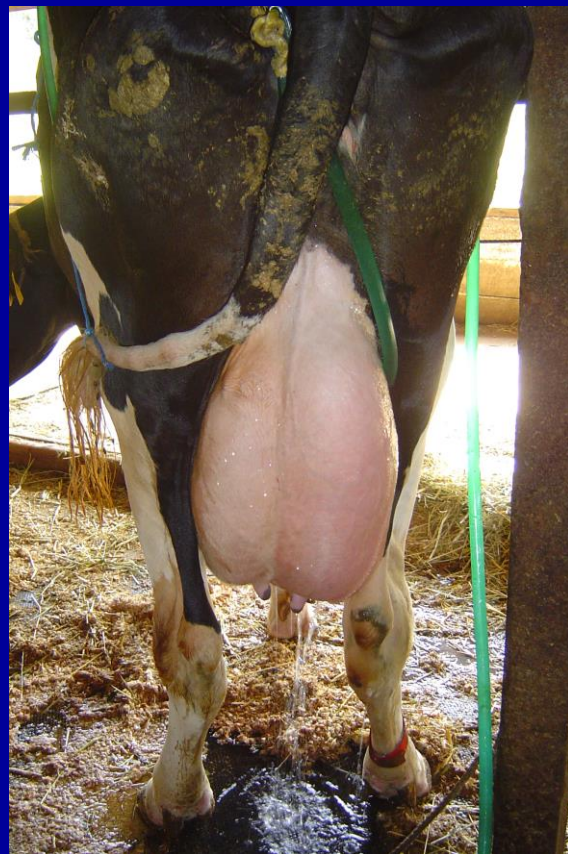


洗淨実施前と実施後



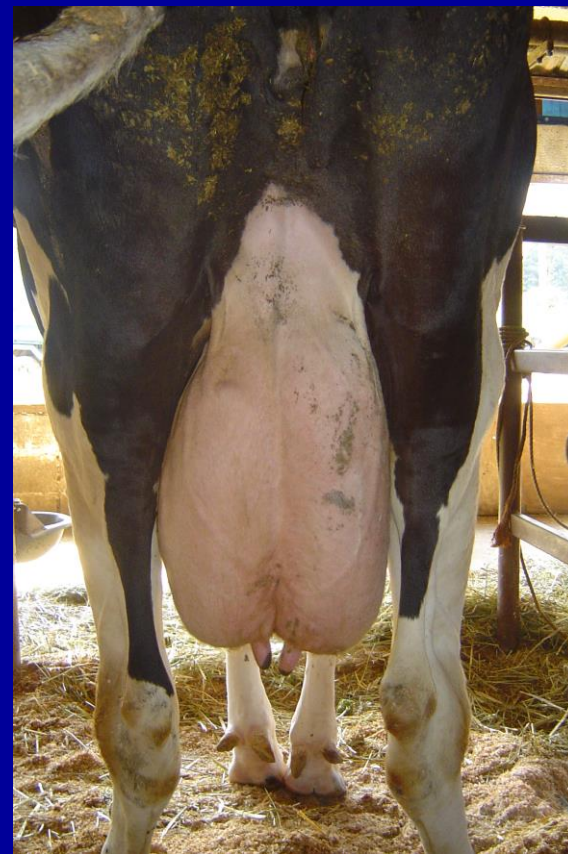
洗淨前(オゾン水3L)

BT 40.5°C



洗淨後(50分後)

BT 39.8°C



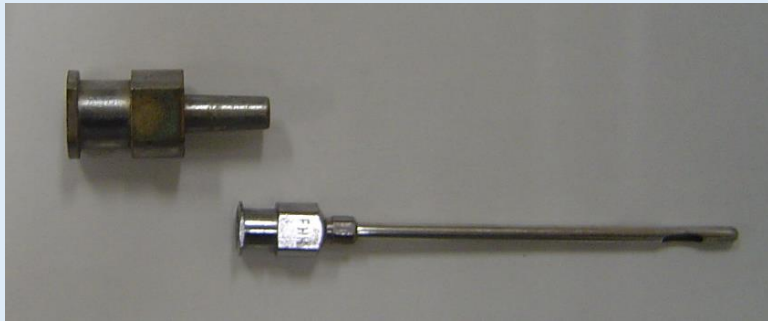
第9病日

乳房内洗浄療法の総括

- 効果がある(治癒・乳量回復)
- 乳房内洗浄を行えば医原性LPSの影響はない
- 衛生的に行えば安価で安全な治療
 - 農家でも実施可能(早期治療)
 - 残留なし
- 洗浄液の殺菌力より物理的なことが重要
- 菌だけでなく乳房内のサイトカイン・エンドトキシン・好中球も排除可能

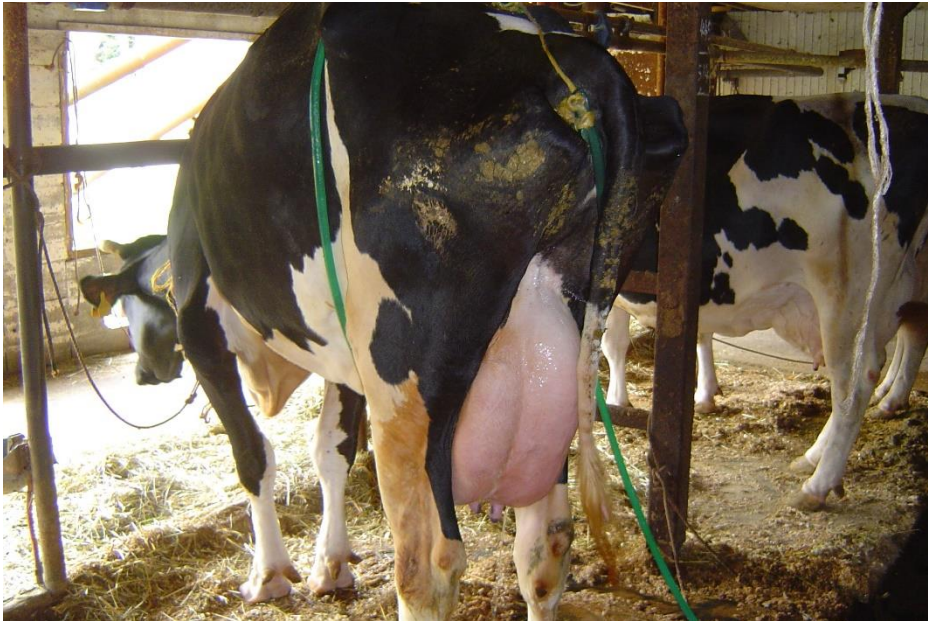
乳房内洗浄療法実施手順

- 罹患分房を搾りきる(一本目のHSSにアトニン)
- 冷えた生食を無菌的に入るだけ注入(500mlくらい)
- 搾りきる
- 同様に生食を再注入・搾りきりを繰り返す
- 洗浄回収液中にブツが出なくなっって、かつ温度が熱くなくなったら終了



乳房を冷却することも大事

- 乳房内と外から冷却
 - クラージン、灌流など
- 好中球に与える影響

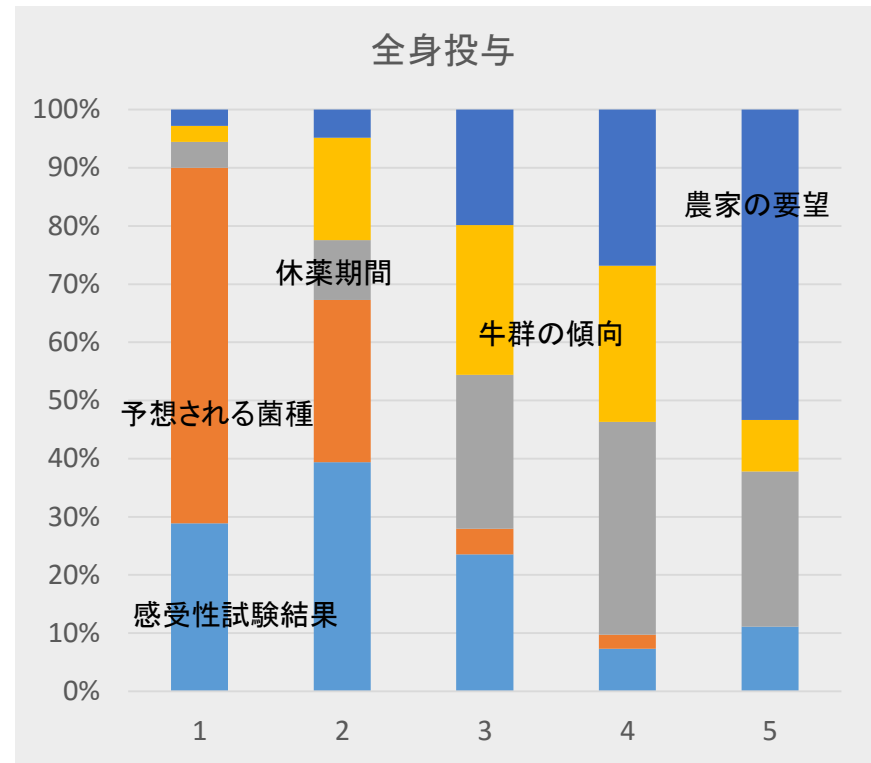


洗淨中に回収したブツ



抗菌剤の選択の基準

- 原因菌の推定
- 薬剤感受性
- 臓器移行性
- 病態に適した特性
- 薬剤耐性リスク
- 抗菌作用以外の性能
- コスト



優先順位

乳房炎で全身投与する抗菌剤の選択基準に関するアンケート(n=192)

ACMの抗菌剤投与エビデンス

• 実験感染か野外感染か

殆どが*E.coli*の研究

Study	効果あり	効果なし
野外	Ceftiofur (Erskine 2002)(coliform)	ゲンタ、エリスロ (Jones 1990) OTC (Morin 1998) Ceftiofur (Wenz 2005) ERFX (pyorala 1998) ERFX (Soujala 2010) ERFX (Persson 2013)
実験	Cefquinome (Shpigel 1997) ERFX (Hoeben 2000) ERFX (Rantala 2002) Danofloxacin (Poutrel 2008)	ゲンタ (Erskine 1992) トリメトプリム (Pyorala 1994)

評価は混とんとしている

大腸菌性乳房炎治療の世界的指針

*E.coli*の場合

症状		異常乳のみ	局所症状のみ	全身症状		
分類		mild	moderate	severe		
				mild	moderate	severe
治療	全身	非推奨	非推奨	FQ、第ⅢまたはⅣ世代セファロスポリン		
	局所	非推奨	非推奨	非推奨		

Treatment for bovine Escherichia coli mastitis-
an evidence based approach L. Suojala (2013)

系統	成分名	商品名
Fluoroquinolone	Enrofloxacin	バイトリル
3 rd cephalosporin	Ceftiofur	エクセネル
4 th cephalosporin	Cefquinome	セファガード・コバクタン

クレブシエラか大腸菌か

- 大腸菌
 - 必ずしも抗菌剤は必要でない
- クレブシエラ
 - 抗菌剤は必要



初診時にはどちらかわからないのでいずれも抗菌剤は使用
2診目以降の抗菌剤の使い方

*E.coli*の薬剤感受性率(2013)

	n	ABPC	CEZ	CXM	KM	GM	OTC	ERFX	OBFX
北海道a)	13604	63.8	81.2	89.1	87.1	99.0	64.8	99.6	96.4
千葉	57	59.6	71.9	64.9	21.1	-	50.9	-	-
山形	111	20.0	90.0	91.4	75.7	-	58.6	-	-
岡山	25	0	35.3	11.8	5.9	-	-	-	64.7
愛媛	45	44.4	88.9	-	71.1	-	61.4	-	92.7
熊本	43	17.0	81.0	81.0	90.0	100	10.0	86.0	88.0

a) 大腸菌群

牛の乳房炎治療ガイドライン(2015)より

Klebsiella spp.の薬剤感受性率(2013)

	n	ABPC	CEZ	CXM	KM	GM	OTC	ERFX	OBFX
北海道a)	13604	63.8	81.2	89.1	87.1	99.0	64.8	99.6	96.4
千葉	19	26.3	26.3	57.9	31.6	-	52.6	-	-
山形	43	0	79.3	75.9	82.8	-	65.5	-	-
岡山	7	0	0	0	0	-	-	-	40.0
愛媛b)	38	6.0	89.2	-	86.5	-	54.1	-	90.6
熊本	27	0	67.0	63.0	37.0	96.0	30.0	70.0	66.7

a) 大腸菌群

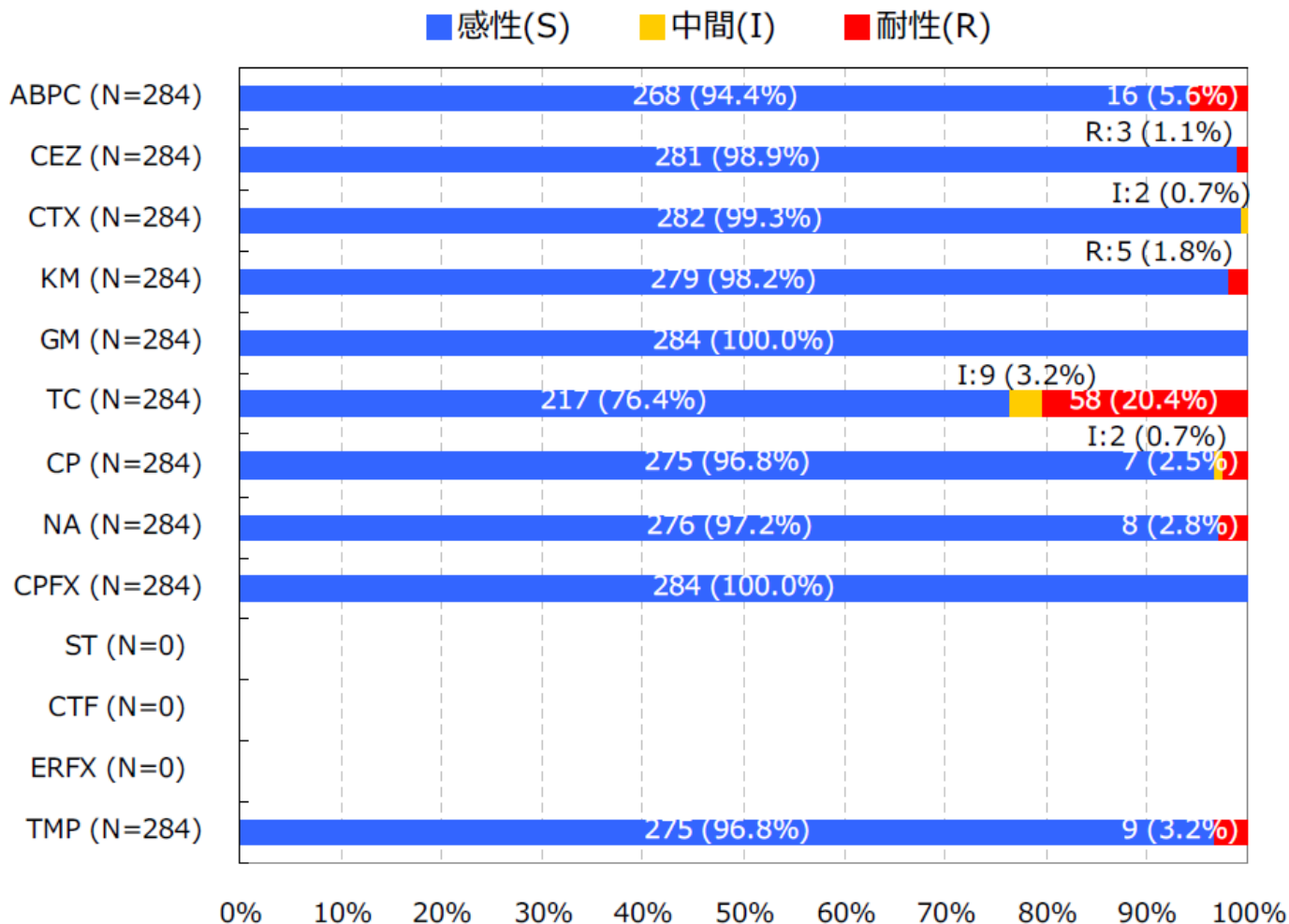
b) *Klebsiella pneumoniae*

牛の乳房炎治療ガイドライン(2015)より

7. 主要菌の抗菌薬感受性*

糞便由来 *Escherichia coli*

畜種 (肉用牛)



分布容積 (Vd: volume of distribution)

$$\text{分布容積: 組織移行性を表す薬物動態学的パラメータ} = \frac{\text{体内薬物量 (X)}}{\text{血漿中濃度 (Cp)}}$$

組織移行性が悪い薬物 (分布容 0.25 L/kg 以下)

アミノグリコシド系、コリスチン、ビコザマイシン

組織移行性があまり良くない薬物 (分布容 0.25~0.4 L/kg)

初期のペニシリン系、セフェム系

組織移行性の良い薬物 (分布容 0.4~1 L/kg)

サルファ剤、アンピシリン、アモキシシリン、新β-ラクタム系、
フロルフェニコール、フルオロキノロン系

組織移行性は良いが、体の一部に局在している可能性のある薬物 (分布容 1 L/kg 以上)

マクロライド系、テトラサイクリン系

臓器移行性

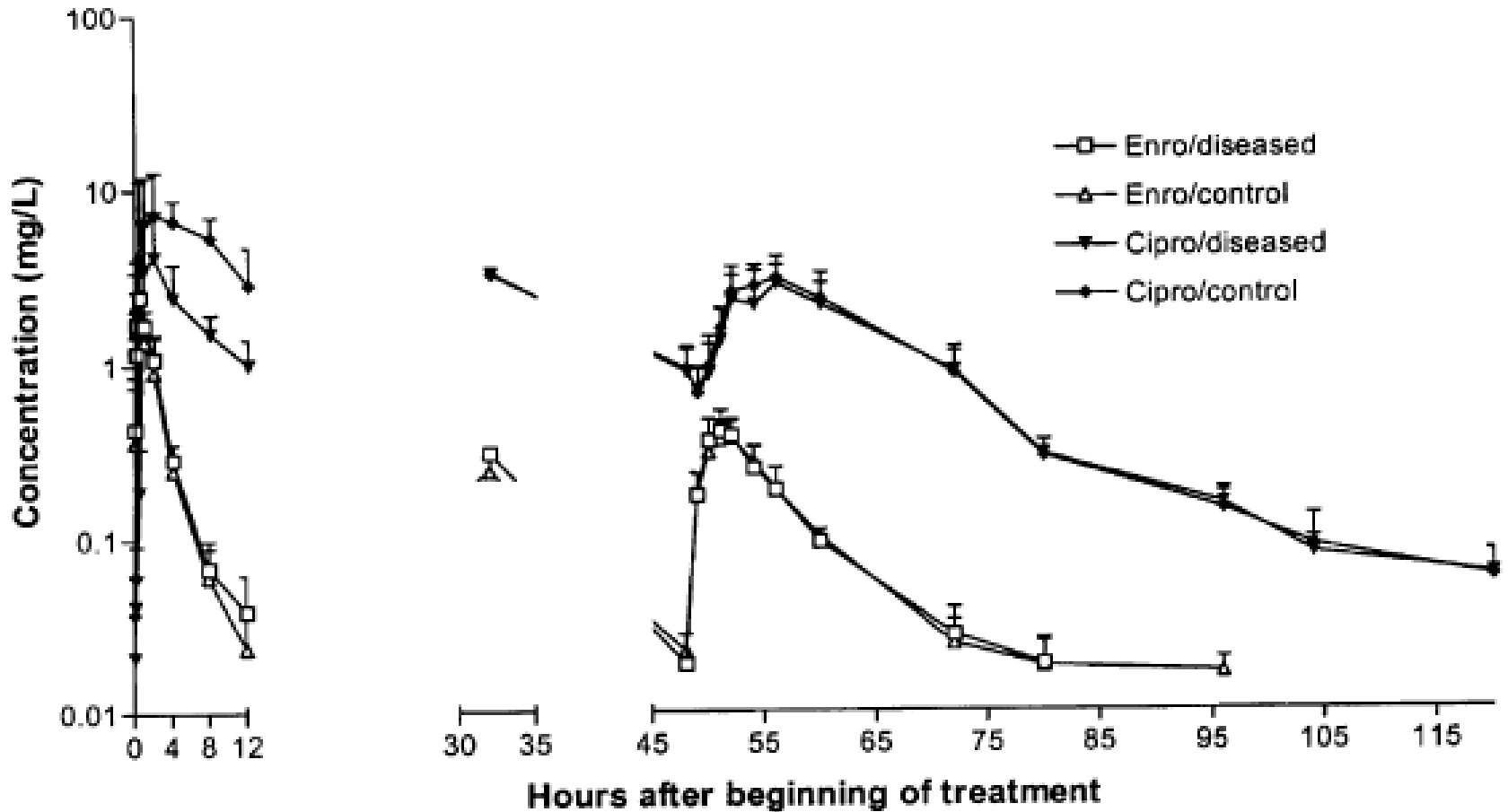
- Ceftiofurは乳汁移行性がよくない (Erskine 1995)
- Cefquinomeは組織濃度がばらつく (Ehinger 2006)
- Enrofloxacinは血清中より乳汁中濃度が高い (Kaartinen 1995, Mestorino 2009)
- Marbofloxacinは組織濃度が高い (Kietzmann 2008)
- OTCは乳汁中のカゼインとキレートするので有効濃度に達しにくい (Erskine 2003)
- アンピシリンやセフトリオキサム、ペニシリンは乳房内への薬剤分布が不十分
- 薬物動態学、薬力学的にグラム陰性桿菌による乳房炎に適した抗菌剤は少ない (Erskine 2003)

炎症動物での薬剤移行性

- 大腸菌実験感染牛6頭(クロスオーバー試験)
- 12時間後Baytril®5mg/kg i.v. (flunixin併用)
- i.v.24、48時間後 5mg/kg s.c.
- Enrofloxacin, ciprofloxacinの濃度(血清・乳汁)測定

炎症動物でも同様の薬剤移行

Enrofloxacin and ciprofloxacin in milk



M. Rantala *et al.* *J. vet. Pharmacol. Therap.* 25, 251-258, 2002

炎症動物での薬剤移行性

- 大腸菌実験感染牛6頭(クロスオーバー試験)
- 12時間後Baytril®5mg/kg i.v. (flunixin併用)
- i.v.24、48時間後 5mg/kg s.c.
- Enrofloxacin, ciprofloxacinの濃度(血清・乳汁)測定



Cmax/MICは皮下注射よりも静脈注射の方が高かった
感染乳房内の薬剤濃度は健常牛と同じだった

病態に適した特性

- ACMはLPSによる非特異的な炎症
- 抗菌剤投与による医原性LPSの影響
 - 追加LPS刺激の生体に対する相乗的な影響の可能性
 - 抗菌剤、菌の増殖、臓器などへの有害な作用
- 病態ステージによって医原性LPS放出の臨床的意義は異なる
 - 正しい病態ステージの診断

抗菌剤の効果



抗菌薬によるLPS放出の考え方

- 抗菌剤のターゲットによる違い
 - 細胞壁・細胞膜・DNA・葉酸合成・タンパク合成
- 濃度による違い
 - 時間依存・濃度依存
- 感受性による違い
- 菌種・菌株による違い

量



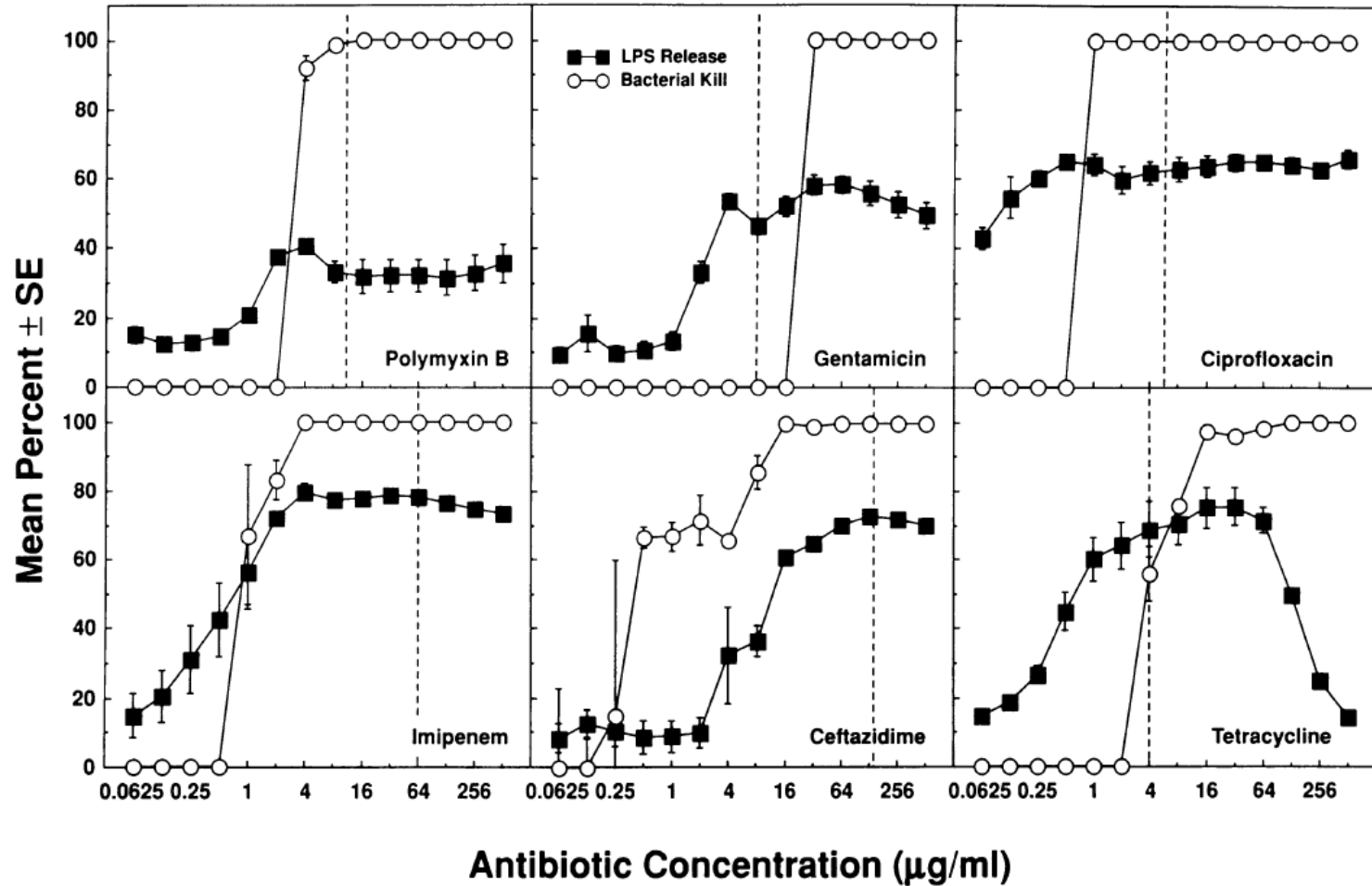
LPSの構造によって生物活性は異なる

質



抗菌剤によってLPSは放出されるという認識をもつこと

LPS遊離量は抗菌剤のクラスと濃度による



LPS放出理論の臨床への応用

- 抗菌剤の選択と使い方でLPS放出量・スピードは異なる
- 菌種・菌株により放出されるLPSの量と質は異なる
- LPSに対する生体反応は個体によって異なる(寛容)



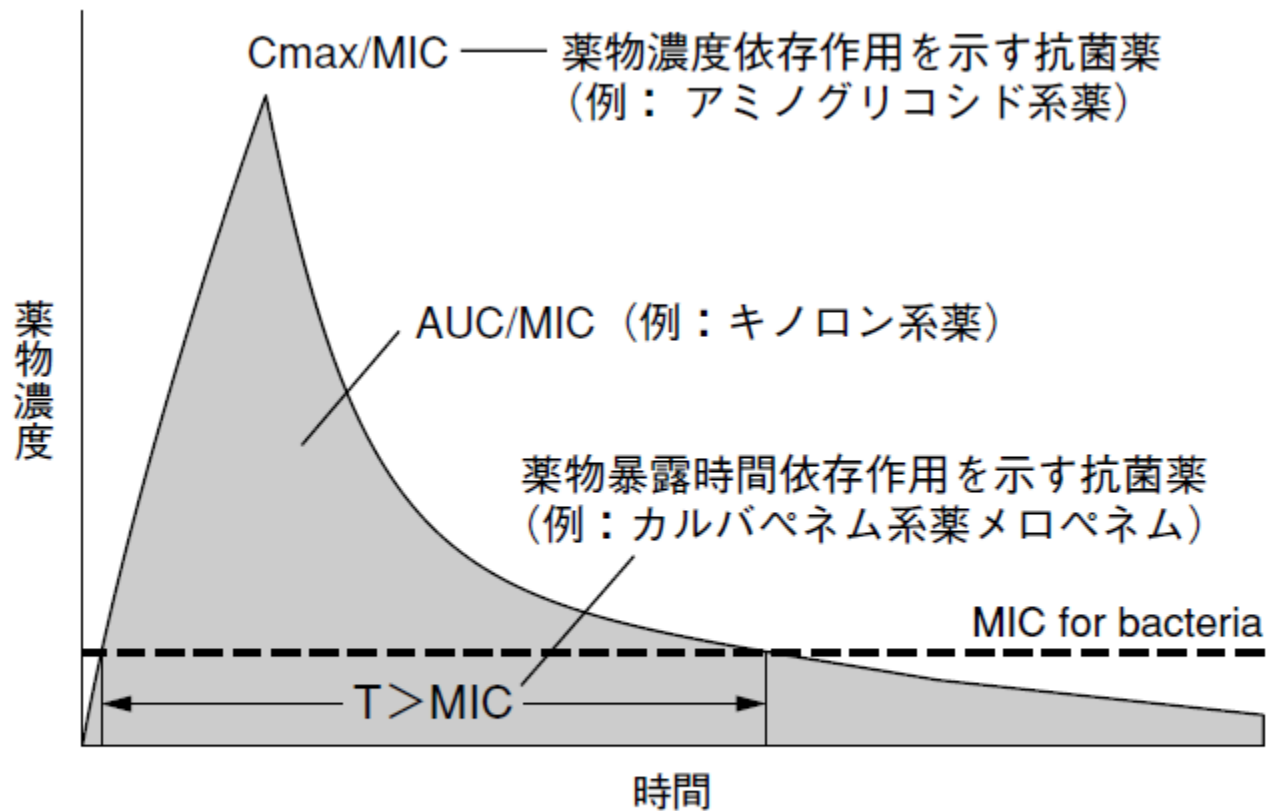
この中で獣医師が介入できるのは抗菌剤の選択と使い方だけ！

LPS放出からみた抗菌剤の選択基準

- 薬剤感受性があり
- 感染部位に到達し(させ)
- 高濃度で維持
- 低放出性の殺菌メカニズム

抗菌剤の作用機序だけで臨床上の決定行為とするには危険

時間依存性と濃度依存性



抗菌薬の代表的な PK-PD パラメータ
(C_{max}/MIC 、 AUC/MIC および $T > MIC$)

PAE(Post-antibiotic Effect)

「ある抗菌薬が微生物に短時間接触した後に持続してみられる増殖抑制効果」、すなわち、血中もしくは組織内からその薬剤が消失した後も、微生物の増殖をある一定期間抑制できること

Antibiotics in Laboratory Medicine : 403－431, 1991

抗菌薬	細菌	PAE (時間)	
		<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>
β -ラクタム剤	グラム陽性球菌	1～2	2～6
	グラム陰性杆菌	<1	<1
蛋白, 核酸合成阻害剤 アミノグリコシド ニューキノロン テトラサイクリン マクロライド クロラムフェニコール リファンピシン	グラム陽性球菌	2～6	4～10
	グラム陰性杆菌	2～6	2～8

抗菌剤の特性まとめ

	テトラサイクリン	マクロライド	ペニシリン	βラクタム	アミノグリコシド	キノロン
効果	静菌的		殺菌的			
依存型	時間依存			濃度依存		
PAE	G(+) G(-)		G(+)		G(+) G(-)	
PK/PDパラメータ	AUC/MIC		%T/MIC		Cmax/MIC	AUC/MIC (AUC/MPC)
排泄型	腎	胆汁	混合		腎	

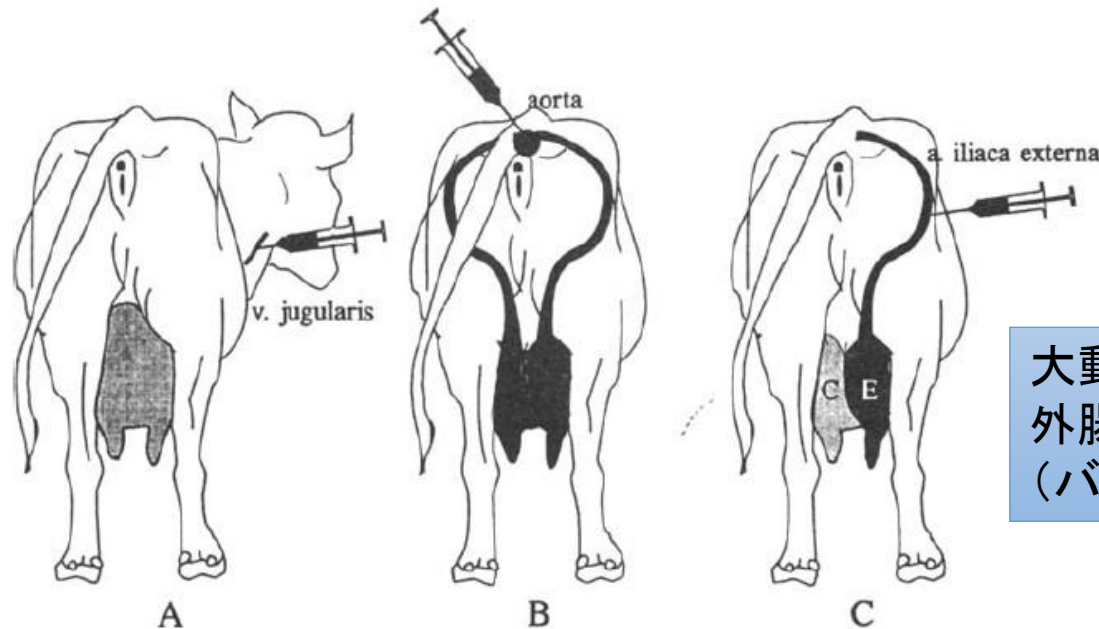
Cmax/MIC: 最高血中濃度(一回投与量)に相関

AUC/MIC: 一日投与量に相関(PAE)

%T/MIC: 一日のうち抗菌薬の血中濃度がMICを超えている時間

抗菌剤の投与方法

- 動・静脈内注射
 - 濃度依存性の抗菌剤
- 点滴注射
 - 時間依存性の抗菌剤



大動脈注・・・静脈注の2.2倍
外腸骨動脈注・・・対側の4.8倍
(バイトリルの場合)

Fig. 1. Experimental design. Enrofloxacin (5 mg/kg BWI) was administered via the jugular vein (A), abdominal aorta (B) and external iliac artery (C).

乳房内注入は？

- バイオフィルム形成と乳房内pHは負の相関
- 酸性の抗生剤を使用している場合は、pHを上昇させることでバイオフィルム形成を抑制できる

Atulya ら *Res Vet Sci* (2014)

- このことを考慮した治療が必要か？

症状		異常乳のみ	局所症状のみ	全身症状		
分類		mild	moderate	severe		
				mild	moderate	severe
治療	全身	非推奨	非推奨	FQ、第ⅢまたはⅣ世代セファロスポリン		
	局所	非推奨	非推奨	非推奨		

ここまでのまとめ

- 原因菌の推定
- 薬剤感受性
- 臓器移行性
- 病態に適した特性
- 薬剤耐性リスク
- 抗菌作用以外の性能
- コスト

じゃ、何を使うべき？



カナマイシン・・・

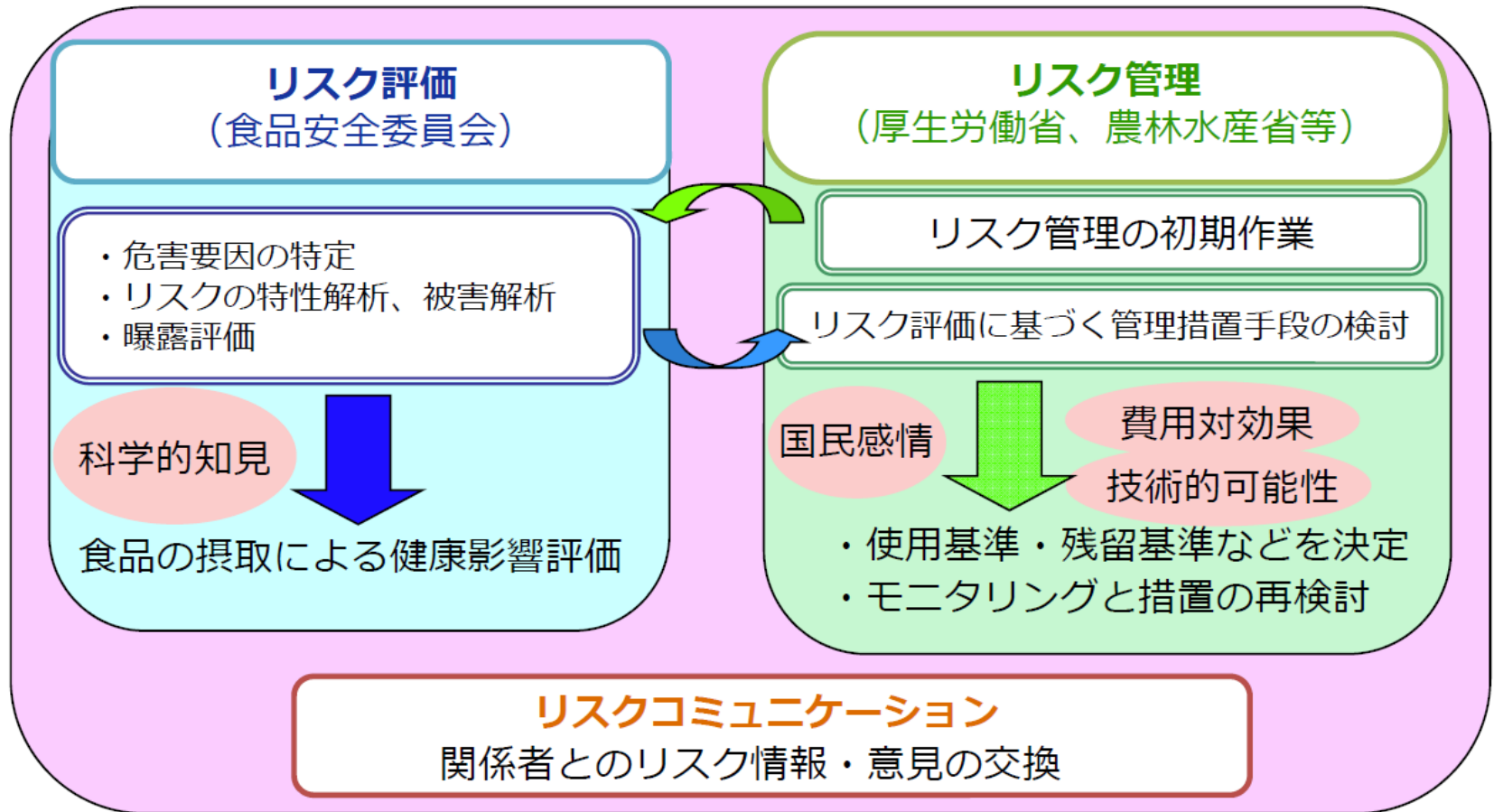
セファゾリン・・・

OTC・・・

フルオロキノロン・・・

第三・第四セファロスポリン・・・

現在の日本のしくみと対応



農水省パンフレットより引用

農水省によるリスク管理措置

フルオロキノロンは医療分野における極めて高度に重要な抗菌性物質で、リスクの推定区分は中等度と評価



農水省はリスク評価の結果をうけて、リスク管理措置を講じている

第3世代セフェム系やフルオロキノロン系の使用は

I 第一次選択薬が無効な場合

II 薬剤感受性試験の結果によって他に有効な薬剤がないことが明らかな場合

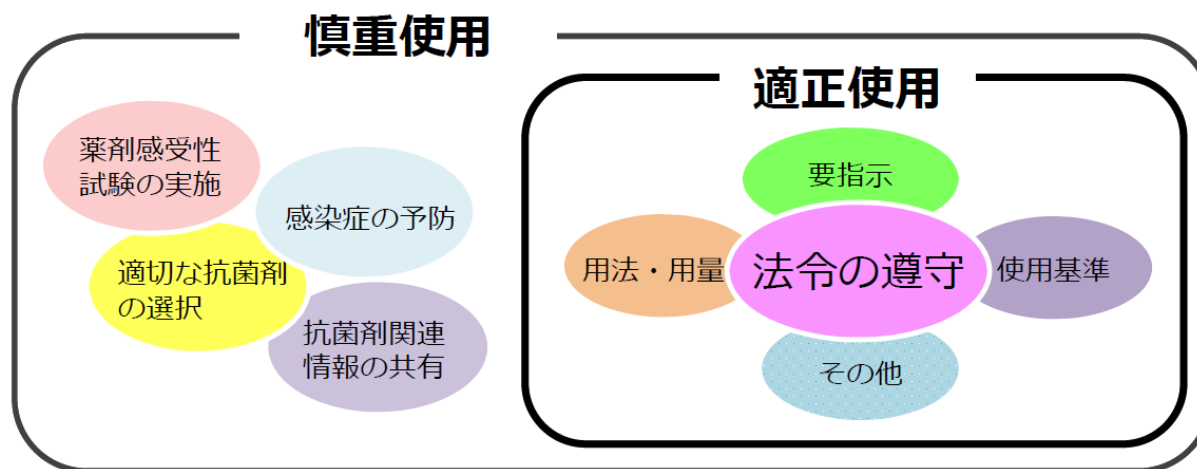
家畜共済における抗菌性物質の使用指針より

大腸菌のフルオロキノロン耐性率	2014年	2020年(目標値)
医療分野	45%	25%以下
畜産分野	4.7%	G7各国の数値と同水準

動物用抗菌剤の慎重使用

- 慎重使用とは

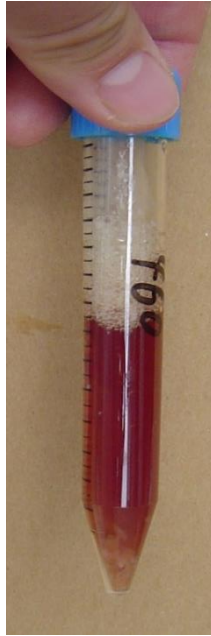
- 抗菌剤を使用すべきかどうかを十分検討したうえで、抗菌剤の適正使用により最大の治療効果を上げ、薬剤耐性菌の選択を最小限に抑えるように使用すること。「適正使用」よりさらに注意して抗菌剤を使用すること。



病状の悪化は抗菌剤の効果を 下げる



炎症遷延化例



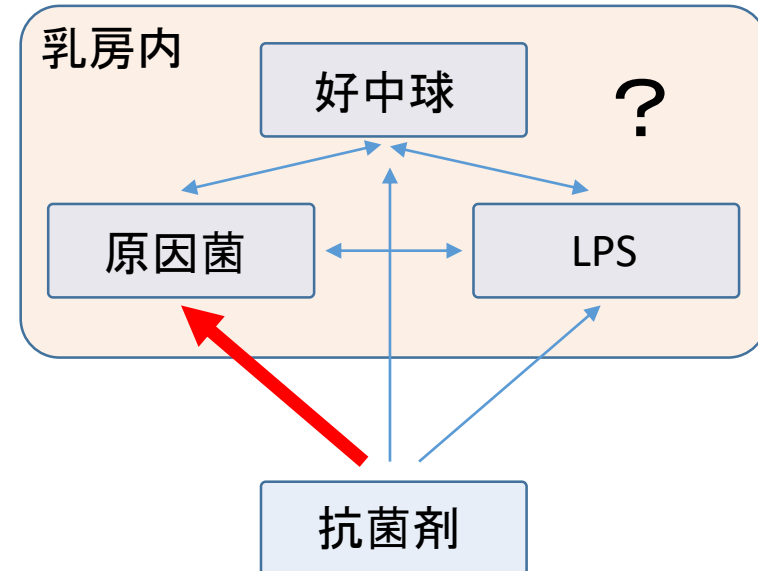
この症例に対してFQを2次選択
しても効果は期待できない

初期治療における適切な抗菌薬
の選択が極めて重要

医療行為そのものが症状に寄与している？

抗菌薬は抗菌作用以外の性能をもっている

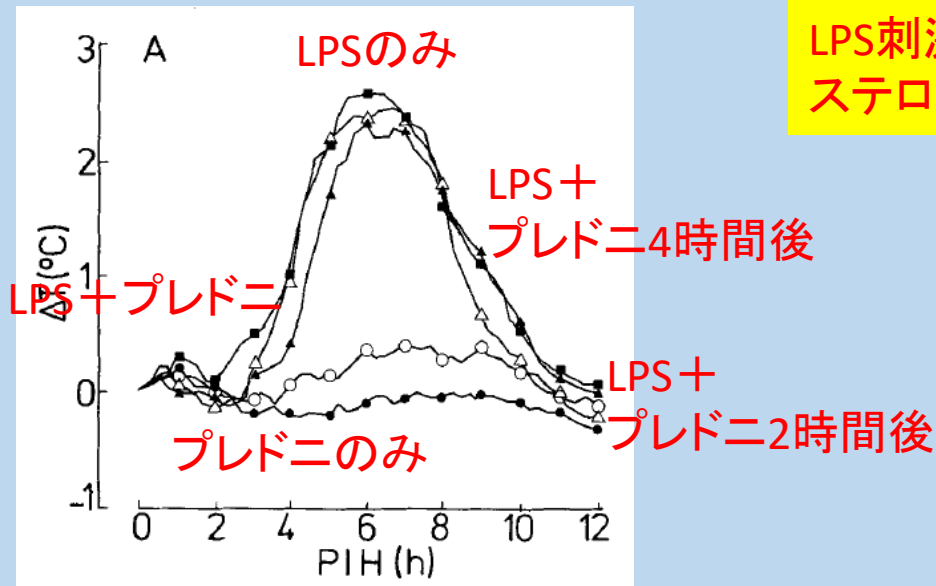
- FQは好中球の殺菌作用を増強 (Hoeben 1997)
- FQはTNF- α の濃度を減少 (全身・局所) (Hoeben 1999)
- マクロライドの炎症細胞に対する作用
 - 好中球への作用
 - リンパ球への作用
 - 単球・マクロファージへの作用
 - LPS活性化好中球への作用？



LPSに対する生体の反応とコントロール

- LPS乳房炎に対する乳房内ステロイド投与の効果

ステロイド乳房内注入



LPS刺激2時間後の
ステロイド注入が効果的

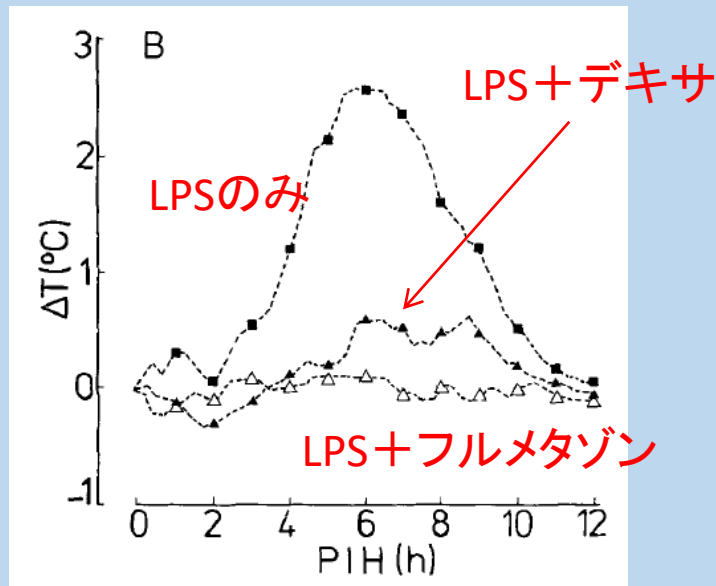


2時間前のLPS刺激に効果あり

LPSに対する生体の反応とコントロール

- LPS乳房炎に対するステロイド全身投与の効果

ステロイド全身投与



LPS刺激と同時の
ステロイド全身投与が効果的



抗菌剤投与はステロイド全身
投与と併用が望ましい

医原性LPSに対する生体反応を抑制するには

抗菌剤投与時にデキサを併用しましょう

<注意>

これは病態が「局所感染のあるSIRS」の場合です
グルココルチコイドは末梢血管弛緩作用があるので、ショック(循環不全)に陥り血圧が低下している場合は使用注意

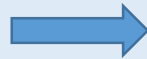
局所感染の存在するSIRSの治療

- 乳汁採材・採血
- オキシトシン混じた補液
- 頻回搾乳・乳房内洗浄などによるLPS、原因菌、好中球などの物理的排除
- 乳房冷却、消炎剤、ステロイド投与、補液
- 適切な抗菌剤投与

優先順位が存在するので 一日二回治療しましょう

抗生剤は使わない
乳房冷却(灌水・湿布)
頻回搾乳
乳房内洗浄
乳房内ステロイド投与

一次治療



ステロイド投与
頻回搾乳
乳房内洗浄
循環管理
抗菌剤投与

二次治療

一日二回往診するのは大変なので
一次診療は農家にしてもらいましょう

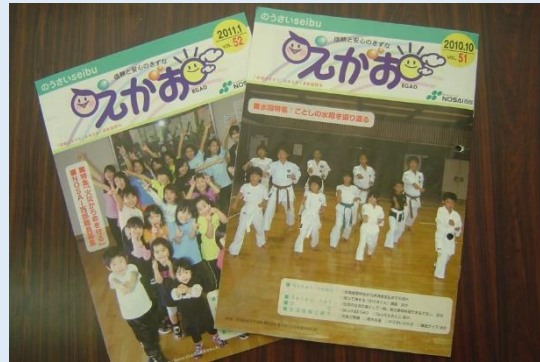
臨床現場での取り組み

	実施者	実施内容	
仮診断		検体採取・往診依頼	抗菌剤使用禁止
一次治療	農家	頻回搾乳	物理的な菌量減少
		乳房内洗浄	
		ステロイド投与	LPSに対する生体反応抑制
		乳房冷却	冷水灌流・冷湿布
本診断		乳汁培養	
二次治療	獣医師	抗菌剤投与	LPS放出特性・感受性・ 薬物特性・体内動態
		全身管理	

農家と一緒に取り組むことが重要

農家をいかに取り込むか

- 基本的な信頼を得る
- ACM一次治療を目の前で行う
- 重症例を救う
- 講習会を行う
- 広報誌を使う
- 口コミを使う
- 褒める
- 病気を見つけた人の、どうにかしたい！という心理を利用

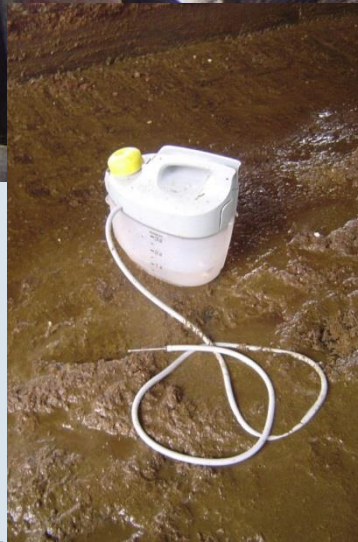
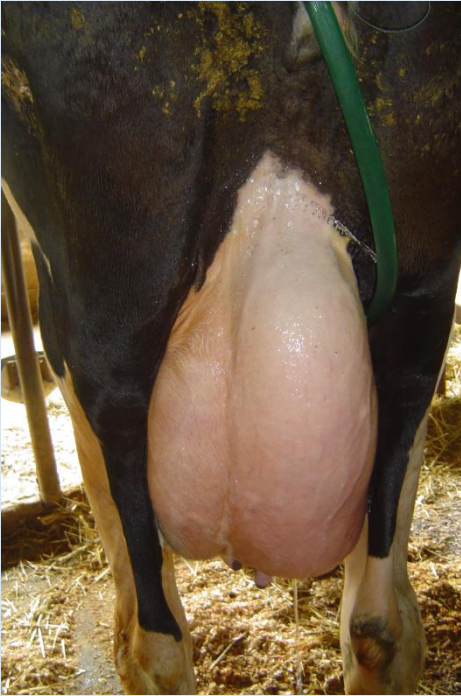


大腸菌性乳房炎の特徴

- 水の様な乳汁
- 乳は柔らかいのに熱がとても高い
- 熱のわりにエサを食べない
- 4分房ともほとんどでなくなった
- 立ちにくい
- 下痢をしている
- 目が赤い



酪農家による一次治療例



洗浄を終える目安はブツの
出方と回収液の温度
500ml × 4回くらい

これでも褒める！

敗血症性ショックの治療

- 循環管理・体液管理
 - LPSの血管拡張作用・血管透過性亢進
- 原因菌コントロール
 - Bacterimia 30%
 - 敗血症時の抗生剤投与によるLPS放出は問題にならないとの文献あり
- LPSコントロール
 - 血中LPS・・・肝マクロファージ、ウルソ
 - 局所LPS・・・好中球？物理的排除

ショック・・・生体が必要とするよりも心拍出量が少ない場合、そしてそれを補正しないと死に至る重症なもの

ACMの治療

- 病態ステージに応じた治療が重要
 - SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome)
全身性炎症反応症候群
 - SHOCK (Warm Shock)
 - SHOCK (Cold Shock)
 - MODS (Multiple Organ Dysfunction Syndrome)
- 大腸菌かクレブシエラかで方針が異なる
 - 抗菌剤の投与期間？

クレブシエラか大腸菌か

- クレブシエラは重篤化しやすい
 - LPS構造の違い
 - クレブシエラは初期の免疫をかいくぐってある程度感染してから発症
- クレブシエラは慢性化しやすい
 - クレブシエラは菌制御が重要
- クレブシエラ乳房炎の推奨される治療法はまだない

ACMの治療 まとめ

病態	治療	
	理論	実践
SIRS	炎症管理 原因菌管理 全身管理 一次治療と二次治療	ステロイド 乳房内洗浄 抗菌剤 補液 農家による一次治療
SHOCK	SIRS+循環管理	HSS 大量補液
MODS	SHOCKに準ず	

原因菌がクレブシエラの場合は抗菌剤投与期間が重要？

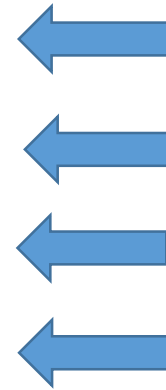
現在行われているACMの治療の課題

- 原因菌が正確に同定されていない
- 大腸菌の治療率は高いがクレブシエラは低い
 - 大腸菌90%・クレブシエラ50%
- 治癒後の罹患分房乳量回復が低い
 - 特にクレブシエラ

ACM治療のゴールは？

獣医師のゴール

- 罹患分房泌乳完全回復
- 罹患分房泌乳量減少
- 罹患分房のみ泌乳停止
- 全分房泌乳停止
- 全身症状回復せず廃用
- 死亡



?

ゴール(以上)を目指した治療が必要

ゴールは農家が決める

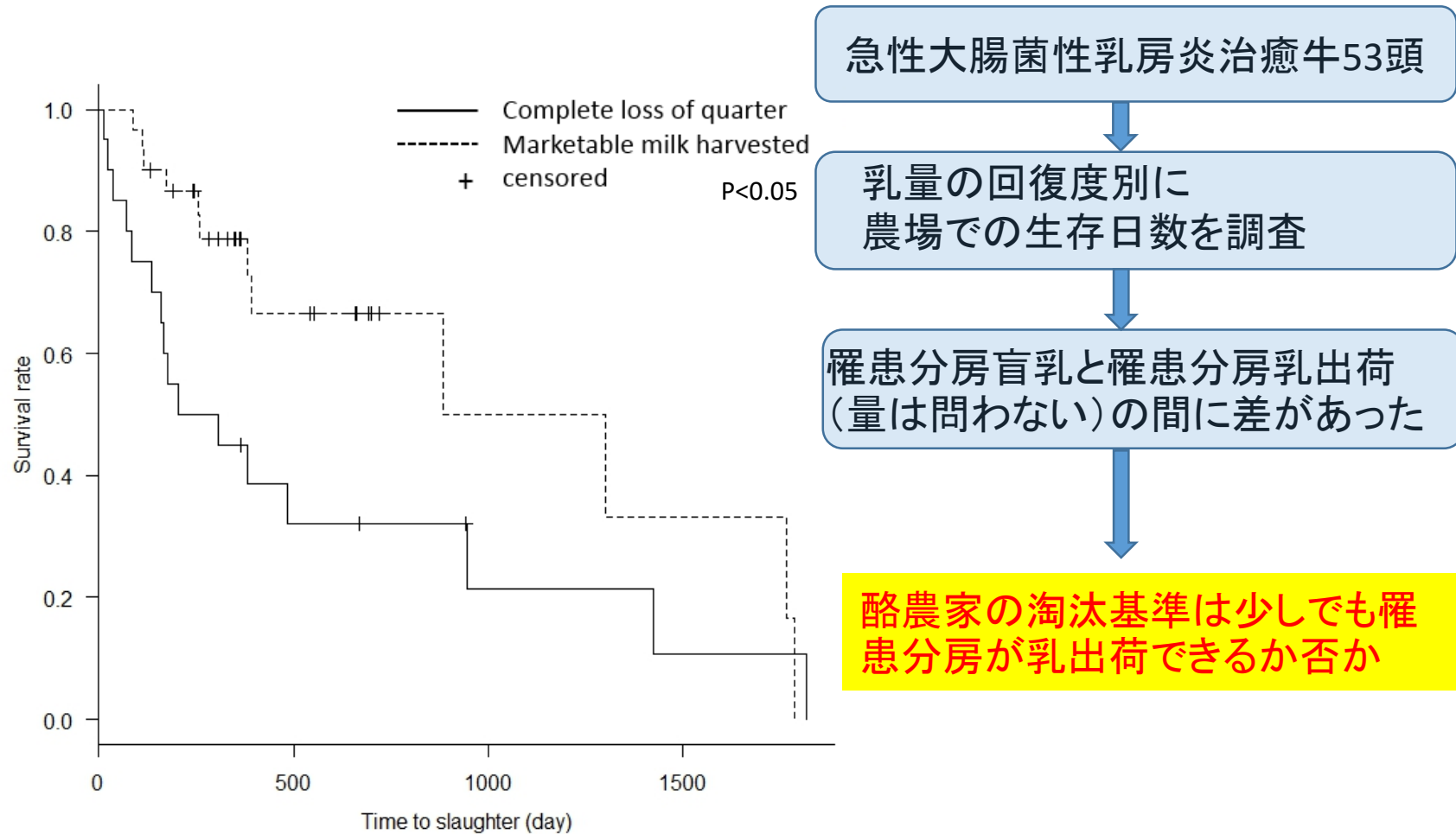
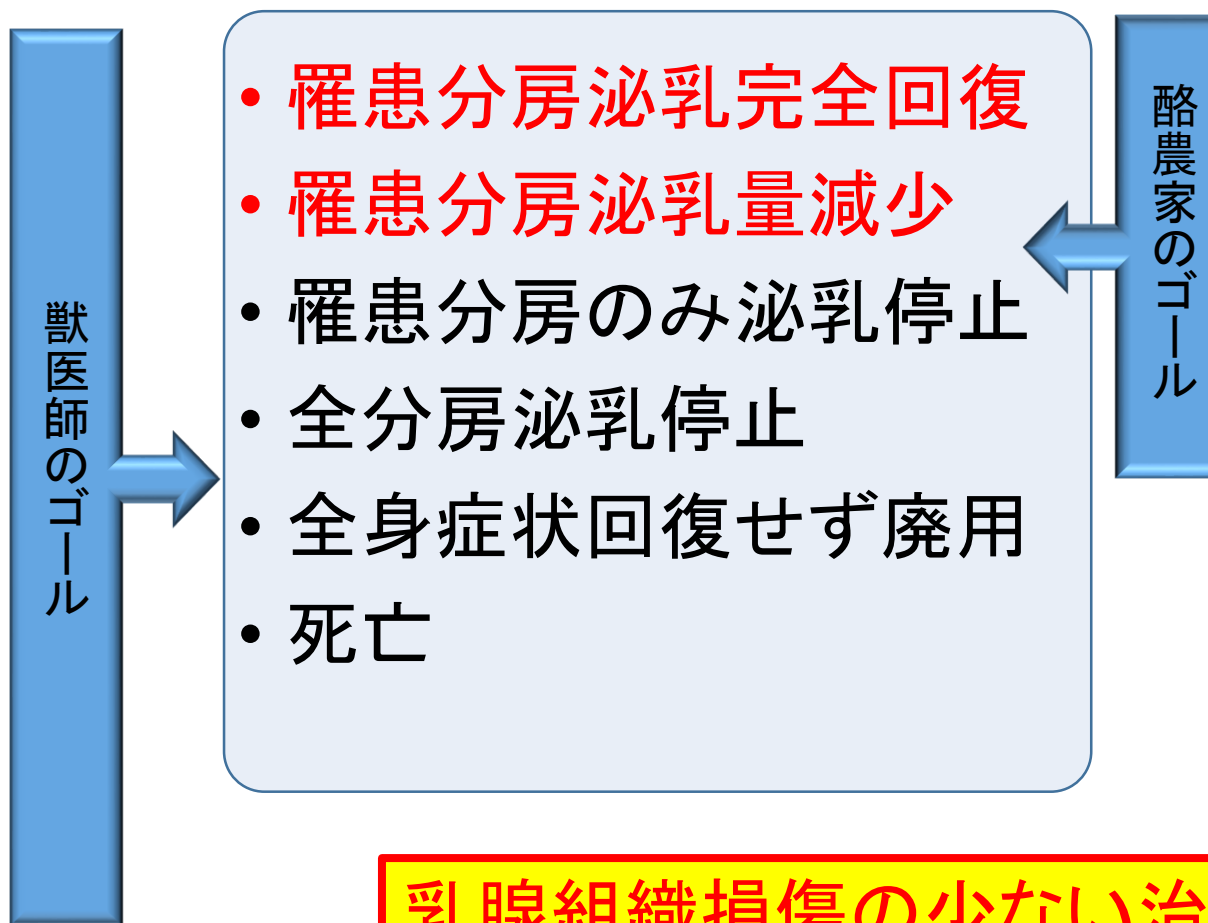


Fig. 1. Kaplan-Meier survival curves for milk production after acute mastitis.

罹患分房の乳出荷回復がゴール



乳腺組織損傷の少ない治療に需要

ACM後の泌乳量と関連する要因調査

• 目的

- ACM治癒後の泌乳回復と関連する要因とその影響度を明らかにする

• 研究デザイン

- 回顧的研究(コホート内ケースコントロール)

• 材料と方法

- ACM(重篤度・中)を発症し、治癒した53頭
- 生体要因・・・年齢、分娩後日数、体温
- 微生物要因・・・*E. coli*/*Kleb. pneumoniae*
- 介入要因・・・抗菌剤(全身・局所)、NSAID、SAID(全身・局所)、乳房内洗浄

ACMのゴールに影響する要因は？

Variables	Category	Outcome		P value
		Complete loss of quarter	Marketable milk	
		(n=21)	(n=32)	
Continuous variables ¹⁾				
Age (days)		1746 ± 536	1856 ± 612	0.611
Days in milk (days)		143 ± 135	106 ± 100	0.398
Body temperature (°C)		40.2 ± 0.7	40.1 ± 1.2	0.978
Categorical variables				
Bacteria	<i>Klebsiella</i> spp.	6	12	0.565
	<i>E. coli</i>	15	20	
Systemic antibiotic	None	6	6	
	FQ	2	14	0.013
	Others	13	12	0.099
Local antibiotic	None	5	13	
	FQ	6	13	0.400
	Others	9	6	0.070
Systemic NSAID	No	5	10	0.756
	Yes	16	22	
Systemic steroid	No	16	23	1.000
	Yes	5	9	
Local steroid	No	6	10	1.000
	Yes	15	21	
Mammary irrigation regimen	No	6	4	0.169
	Yes	15	28	

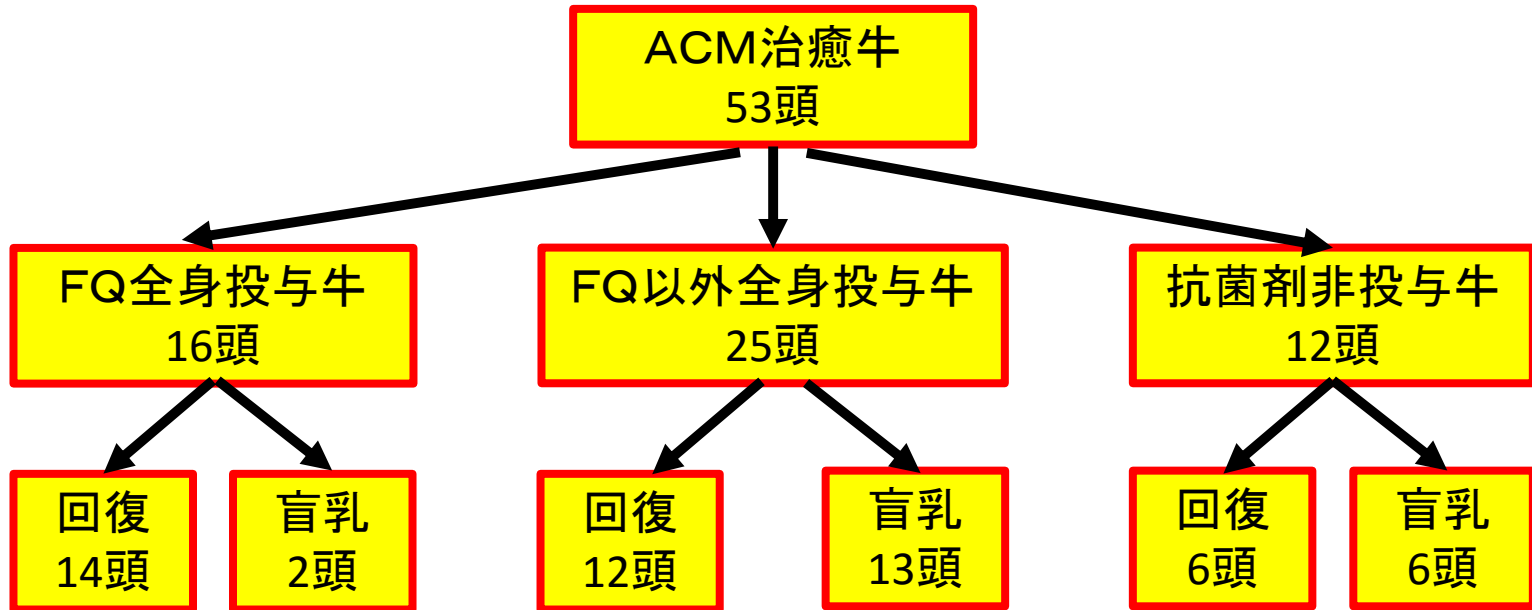
1)The data represent the mean ± standard deviation. FQ, fluoroquinolone; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug.

関連がありそうな要因の各影響度は？

Variables	Category	Adjusted odds ratio	95% confidence interval		P value
			Lower	Upper	
Systemic antibiotic	None	Reference			
	FQ	21.7	1.48	317	0.0247*
	Others	1.74	0.33	9.24	0.517
Local antibiotic	None	Reference			
	FQ	0.18	0.02	1.55	0.119
	Others	0.35	0.06	1.88	0.219
MIR	No	Reference			
	Yes	1.49	0.29	7.65	0.635

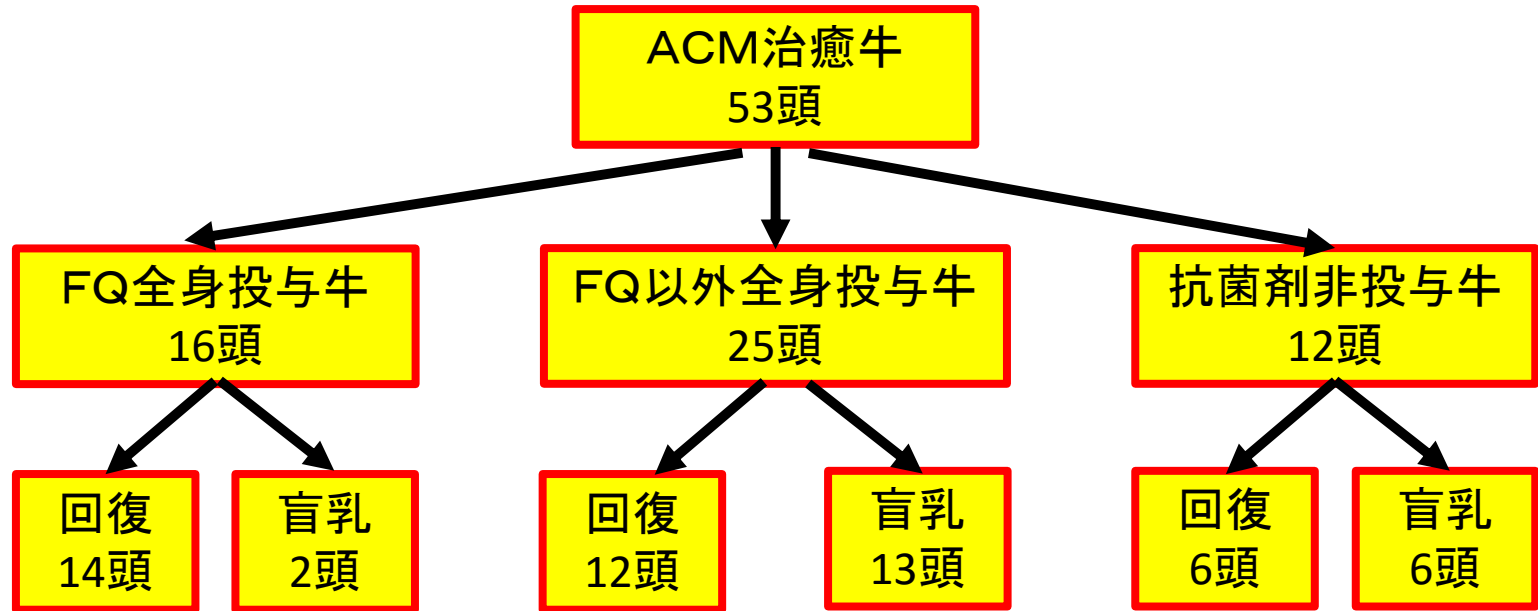
* P<0.05 was considered statistically significant. FQ, fluoroquinolone; MIR, mammary irrigation regimen.

全身投与抗菌剤別のリスク



	抗菌剤投与			比	
	FQ投与	FQ以外投与	なし	FQ/FQ以外	FQ/なし
リスク	0.875(14/16)	0.48(12/25)	0.5(6/12)	1.83	1.75
オッズ	7(14/2)	0.92(12/13)	1(6/6)	7.61	7

全身投与抗菌剤と予後（菌種別）



大腸菌	2	1	7	4	3	1
クレブ	12	1	5	9	3	5

大腸菌は使用の有無を含め抗菌剤の種類によらないが、
クレブシエラは初診時のフルオロキノロン投与は効果があるようだ

本研究の結論

- 重篤度中に分類される急性大腸菌性乳房炎の初診時のFQ全身投与と、治癒後の生産寿命を延長させる罹患乳房乳出荷能の回復は関連がある

注意点：因果関係ではない
治癒症例のみの調査である



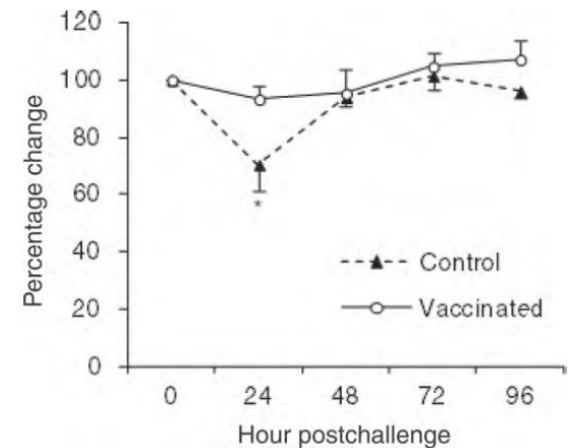
重篤度中に分類される急性大腸菌性乳房炎に対して、
初診時FQ全身投与治療の効果を検証する価値がある

Correlation does not imply causation.

乳量低下はなぜ起きる？

- 乳量の決定要因
 - 乳腺細胞の数
 - 乳腺細胞の機能
 - 乳腺細胞への糖供給
- これまでの報告
 - 乳腺組織損傷原因は好中球, 乳腺組織への菌侵入、host protease and cytokines
 - 抗酸化剤によってNAGase活性値低下
 - LPSの直接作用は否定

LPS100 μ g注入試験
(森本ら 2012)



よりよい治療を実現するために

現在の治療の課題	研究すべきテーマ
クレブシエラの治癒率低い	LPS以外の病原性
クレブシエラの慢性化	実態把握 必要抗菌剤投与期間
乳腺組織損傷による乳量低下	活性酸素制御 好中球制御

ACM抗菌剤治療の課題

- LPS放出の生体への影響を考慮した抗菌剤の選択や投与経路
- LPS放出の生体への影響が重大となる病態のステージの検討
- 抗菌剤のもつ抗菌作用以外の作用の検討
- 抗菌剤エビデンスの多くが大腸菌によるACM
- 練られた研究デザインによる臨床研究
- 抗菌剤必要投与量・経路・期間の検討、最適化
- 薬剤耐性菌問題を考慮した抗菌剤の慎重使用の徹底

抗菌剤の効果

