

博士論文（要約）

酪農における抗菌性物質使用量調査と使用量低減に関する研究

菊池 允人

目 次

要約	1
学位論文に関する出版物	4
他の出版物	5
略語	7
第 1 章 酪農における抗菌性物質使用の現状と課題	9
抗菌性物質使用と薬剤耐性	10
畜産における抗菌性物質使用	11
乳房炎に対する抗菌性物質使用	13
乳房炎とバイオフィルム	14
本研究の目的	16
図	18
第 2 章 日本版動物用 DDD 値 (Defined daily dose) を用いた千葉県内酪農家における抗 菌性物質の使用量評価	19
序論	20
材料と方法	21

結果	25
考察	26
小括	35
図表	36

第 3 章 乳牛の難治性乳房炎に対する高張食塩水による乳房内洗浄とショート乾乳を併用

した治療の試み	43
序論	44
材料と方法	45
結果	49
考察	50
小括	56
図表	57

第 4 章 二価不活化乳房炎ワクチンをもちいた乳房炎防除

序論	71
材料と方法	72
結果	73

考察	74
小括	79
図表	80
第5章 総合考察	85
酪農における抗菌性物質使用の現状と課題	86
乳房炎防除による抗菌性物質使用量低減	87
その他の取り組み	88
臨床獣医師としての提言	89
結論	91
謝辞	92
参考文献	94

要 約

2015 年に WHO 総会で採択された薬剤耐性グローバルアクションプランを受け、2016 年、日本でも薬剤耐性アクションプランが施行され、畜産分野でも抗菌性物質の適切な使用が求められている。そのため現状の抗菌性物質使用量を評価する必要があるが、国内の酪農家においてはそのような報告は少ない。乳牛の代表的な疾病である乳房炎は抗菌性物質の使用量を増加させる主な要因であり、欧州を中心とした諸外国では、特に抗菌性物質の使用量を増加させる乾乳期の乳房炎治療（dry cow treatment : DCT）が問題視され見直される動きがある。また、近年では乳房炎予防のためのワクチンが発売されて普及し始めており、乳房炎防除による抗菌性物質の使用低減効果が期待されている。

本研究は千葉県酪農における抗菌性物質の使用の実態を調査するとともに、抗菌性物質の使用量低減のための臨床技術、および予防法について検討することを目的とした。

本論文は 5 章から構成されており、第 1 章で研究背景と目的、第 2 章で抗菌性物質の使用量調査、第 3 章、第 4 章では抗菌性物質の使用量低減のための臨床現場での取り組みに関する研究内容を述べ、第 5 章ではそれらを総括して考察し論じている。

第 2 章では千葉県の酪農家で使用された抗菌性物質を、Defined daily dose (DDD) 値を用いて集計し評価した。DDD 値は「医療品の主な適応症に対する 1 日あたりの仮想平均維持量」と定義され、医療分野での抗菌性物質使用量調査のために生まれた概念であるが、近年、欧州各国を中心に動物用 DDD 値を設定し、抗菌性物質使用量を評価する取り組みが行われている。本調査では、県内酪農家における抗菌性物質使用状況を 2014 年～2016 年の 3 年間分調査し、製品ごとに定められた日本版動物用 DDD 値を用いて Treatment Days (平

均治療日数)を算出し、解析を行った。また、近年の農家戸数減少・大規模集約化の傾向を踏まえ、抗菌性物質使用量と飼養規模ごとの比較を行った。2016年の1年間については、乳房炎原因菌の薬剤耐性との関連も調べた。その結果、乳房炎に使用される抗菌性物質、特に乾乳期治療に用いられるペニシリンの Treatment Days が最も多いことが分かった。規模別では成牛飼養頭数 30 頭未満の小規模農家よりも 30 頭以上の中・大規模農家の Treatment Days が大きい傾向にあった。また、乳房炎の原因菌で薬剤耐性菌が検出された農家ではより Treatment Days が大きい傾向がみられた。DDD 値を用いて解析したことで抗菌性物質の種類ごとでの比較が可能になり、乳房炎防除の対策をすることで抗菌性物質使用量を低減できる可能性を示すことができた。

第 3 章では、抗菌性物質使用量を増加させる要因の一つである難治性の慢性乳房炎に対する新たな治療法について研究した。*Streptococcus uberis* (*S. uberis*)などを起因菌とする乳牛の乳房炎では、菌が乳房内でバイオフィルムを形成し、抗菌性物質や免疫細胞の作用に抵抗性を示すことで難治化すると考えられている。本研究では、管内酪農家で発生した難治性乳房炎に対して高張食塩水による乳房内洗浄とショート乾乳(3日間の搾乳休止)を併用した治療を実施し、その治療効果について検討した。試験群では対照群よりも有意に高い治癒率が得られたことから、本法はバイオフィルムの関与が疑われる難治性乳房炎に対し有効であり、抗菌性物質使用量低減につながる新たな治療法であると考えられた。

第 4 章では、大腸菌群による甚急性乳房炎や *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)による慢性乳房炎が多発し問題となっていた 1 酪農家で乳房炎ワクチンを使用し、その効果を検証した。当該農場では大腸菌群と *S. aureus* の乳房炎を予防する目的で 2017 年 6 月か

ら二価不活化乳房炎ワクチンの接種を開始した。その結果、2017年度は2015年度と比較してバルク乳の平均体細胞数の減少、乳房炎の診療回数および診療費用の減少が認められ、重篤化する乳房炎が減少したことが示された。また本農家の Treatment Days は2016年に比べ2017年、2018年と大きく減少した。本ワクチンは日本で発売開始されて間もないため今後も継続した検証が必要ではあるが、乳房炎による損失を軽減するとともに、抗菌性物質使用量の低減につながる可能性が示された。

第5章ではこれらの結果を踏まえ、総合的な考察を行っている。第2章の調査で酪農においては特に乳房炎が抗菌性物質使用量を増加させることが示唆された。抗菌性物質使用量の低減のためにはこのような調査によるモニタリングの継続が必要不可欠であり、今後は千葉県に限らず全国的な調査が行われることが望まれる。また、調査の結果を踏まえて抗菌性物質使用量低減を実行するのは畜産農家自身と、産業動物臨床に携わる獣医師の責務である。その実現のためには、第3、4章で行ったような臨床現場での個体診療技術や予防獣医療の研究を今後も積み重ねてゆくことが重要であると考えられる。

学位論文に関する出版物

Kikuchi M, Shimizu H, Matsui T, Okabe T, Matsuda F, Haga T, Sugiura K

Evaluating the antimicrobial use on dairy farms in Chiba Prefecture in Japan using a dose-based indicator from 2014-2016.

Plos One 投稿中

Kikuchi M, Shimizu H, Matsui T, Okabe T, Matsuda F, Haga T, Sugiura K

Antimicrobial use and its association with the presence of MRS and ESBL-producing coliforms on dairy farms in Chiba Prefecture, Japan.

Preventive Veterinary Medicine 投稿中

菊池 允人、菅原 久枝、大谷 夏輝、中村 友彦、田中 秀和、甲斐 千暁、菊 佳男

乳牛の難治性乳房炎に対する高張食塩水による乳房内洗浄とショート乾乳を併用した治療の効果

家畜診療 2019; 66(7): 425-429.

額田聡子、菊池允人

二価不活化乳房炎ワクチンの効果について

千葉県農業共済組合紫葉会会誌 2019; 63: 63-65.

他の出版物 (2014年4月以降)

菊池 允人、大谷 夏輝、中村 友彦、菅原 久枝、田中 秀和、甲斐 千暁、菊 佳男

【牛乳房炎治療における新たな挑戦】乳牛の難治性乳房炎に対する高張食塩水による乳房内洗浄とショート乾乳を併用した治療

臨床獣医 2019; 11月号: 32-36.

菊池 允人

乳牛の同一肢両側蹄角質疾患に対する部分的蹄底ブロック装着とキャスト固定の併用療法

家畜診療 2019; 66(10): 613-620.

松浦 優、鮎川 理、近藤 寧子、大谷 夏輝、菊池 允人、田中 秀和

子牛の難治性下痢症における糞便微生物移植の試み

家畜診療 2019; 66(1): 27-33.

菊池 允人、菅原 久枝、田中 秀和、水谷 英一郎、中村 友彦、平田 昇

牛の金属異物性疾患に対するカウサッカーの有用性および胃内留置用磁石投与による事故低減効果

家畜診療 2018; 65(12): 795-802.

Sato R, Une Y, Madarame H, Hanami H, Kanai E, Murakami H, Tsukamoto A, Suzuki T, Ochiai H, Kikuchi M, Tanaka H, Onda K.

A nasal osteoma with an acute course in a Japanese Black heifer.

Journal of Veterinary Medical Science 2017; 79(7): 1220-1224.

Haneda S, Nagaoka K, Nambo Y, Kikuchi M, Nakano Y, Li J, Matsui M, Miyake Y, Imakawa K.

Expression of uterine lipocalin 2 and its receptor during early- to mid-pregnancy period in mares.

Journal of Reproduction and Development 2017; 63(2): 127-133.

中村 友彦、菊池 允人、田中 秀和、佐々田 純、菅原 久枝、井上 宣子、松浦 優、水谷 英一郎、平田 昇

乳牛における股関節脱臼に対する非観血的整復術の治療効果の検討

家畜診療 2017; 64(2): 81-87.

中村 友彦、菊池 允人、田中 秀和

乳牛における股関節脱臼に対する診断法と非観血的整復術の治療効果の検討（特集 牛診療における超音波画像診断装置の新しい展開）

獣医畜産新報 2016; 69(7): 499-505.

本論文中で使用している略語

ACM: acutE. coliform mastitis

AMR: antimicrobial resistance

BDCT: blanket dry cow therapy

CDC: Centers for Disease Control and prevention

CNS: coagulase negative staphylococci

DCT: dry cow therapy

DDD: defined daily dose

DDDAF: the defined daily dose animal based on the antibiotic usage data of a particular livestock farm

DDDANAT: the defined daily dose animal based on national antibiotic usage data

E. coli: *Escherichia coli*

EMA: European Medicine Agency

ESBL: extended-spectrum beta-lactamase

FDA: Food and Drug Administration

HSS: hypertonic saline solution

MRS: methicillin-resistant staphylococci

MRSA: methicillin-resistant staphylococcus aureus

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development

OS: other streptococci

PCU: population correction unit

QS: quorum sensing

SDCT: selective dry cow therapy

SDA: the Netherlands veterinary medicines institute

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

S. epidermidis: *Staphylococcus epidermidis*

S. uberis: *Streptococcus uberis*

USDA: United States Department of Agriculture

WHO: World Health Organization

第1章

酪農における抗菌性物質使用の現状と課題

抗菌性物質使用と薬剤耐性

抗菌性物質の歴史は古く、Fleming が 1928 年に初めてペニシリンを発見し (Fleming 1929)、1940 年にペニシリンが合成されて以降、様々な種類の抗菌性物質が発見、開発されてきた (Fischbach & Walsh 2009)。1970 年代以降では抗菌性物質の新規開発競争が激化し、先進国を中心により効果が強く、より広域の抗菌スペクトルをもつ抗菌性物質が求められてきた。この時期に、極めて広域なスペクトルを持つカルバペネム系を含む β ラクタム系や、マクロライド系、テトラサイクリン系などは第 2、第 3 世代まで開発された他、セファロsporin系、キノロン系、などは第 4 世代まで改良が進み、バンコマイシンなどの合成抗菌薬も誕生した (Zanel *et al.* 2007; Fischbach & Walsh 2009)。一方、薬剤耐性菌はペニシリンが普及し始めた 1940 年代から存在していたとされるが (Knapp *et al.* 2010)、1980 年代以降、ヒト医療および獣医学分野で急速に多剤薬剤耐性菌が増加している (Laxminarayan *et al.* 2013)。アメリカの Centers for Disease Control and prevention (CDC) や World Health Organization (WHO) は *Clostridioides difficile* やカルバペネム耐性薬剤耐性腸内細菌、extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) 産生腸内細菌、バンコマイシン耐性腸球菌、methicillin-resistant staphylococcus aureus (MRSA)、多剤耐性アシネトバクター、多剤耐性緑膿菌などを重要な薬剤耐性菌として挙げている (CDC 2013; WHO 2017)。また、先進国以上に開発途上国では院内感染が増加しており、*Escherichia coli* (*E. coli*) や *Klebsiella* 属の多くが第 3 世代セファロsporinやゲンタマ

イシンなどの主要な抗菌性物質に耐性を示したとの報告もある (Waters *et al.* 2011)。グラム陰性菌などによる敗血症は生後 4 週間以内の新生児の死亡原因の 25%以上を占め、ほとんどが開発途上国での発生である (Lawn *et al.* 2005)。その治療において、ESBL 産生菌などの多剤耐性菌の増加は深刻な問題である (Viswanathan *et al.* 2012)。

このような薬剤耐性菌が増加する一方で、菌に有効な新規の抗菌性物質の開発は 1980 年代がピークでその後は減少し続けている (Cooper & Shlaes 2011)。英国政府の調査委員会による O'neal report では AMR に関連した死者は毎年約 70 万人おり、2050 年には 1,000 万人に増加することが予測され、世界的な関心を集めている (O'neal 2016)。この O'neal report の最終報告では、解決のための方策として、抗菌性物質使用に関する啓蒙活動、新規の抗菌性物質の供給、診断技術の改良による抗菌性物質のより選択的な使用、そして農業での抗菌性物質使用の削減、の 4 つの介入が特に重要であると述べている。これを受け、最近では実際に低中所得国 (LMIC) での薬剤耐性感染症の調査や、新規抗菌性物質の開発のために大規模な基金が設立されるという動きもある (Seale *et al.* 2017; Mullard 2020)。それらと同様に農業、特に畜産分野での抗菌性物質使用削減に向けた世界規模での取り組みが求められている。

畜産における抗菌性物質使用

畜産において抗菌性物質は家畜の健康維持、人獣共通感染症の予防の他、成長促進の目的

で使用されて様々な恩恵をもたらすが、同時に薬剤耐性菌の増加により公衆衛生上の問題を引き起こす可能性もある諸刃の剣である (Hao *et al.* 2014)。アメリカの Food and Drug Administration (FDA) の調査では、抗菌性物質の販売量のうち 70%以上が畜産を中心とする動物用抗菌性物質であるとしている (FDA 2015)。また近年、経済成長著しい BRICS (ブラジル、ロシア、インド、中国、南アフリカ) などを中心に世界的に畜産物の需要が高まり、農業の大規模集約化が進むとともに、抗菌性物質の使用量も急増しており、今後も増加傾向が続くと予想されている (Van Boeckel *et al.* 2015)。畜産における抗菌性物質の使用量増加は選択圧を高めて薬剤耐性菌の出現につながると考えられており、*E. coli* の薬剤耐性率と抗菌性物質使用量の強い相関の報告 (Chantziaras *et al.* 2014) や、成長促進目的の低用量の抗菌性物質使用と薬剤耐性菌の関連を示す報告 (You *et al.* 2014) もある。

畜産動物由来の薬剤耐性菌は、家畜の感染症治療を困難にするだけでなく、家畜の飼養者を始め、堆肥中や流通している鶏肉においても存在が確認されており、環境や畜産物を通じて多くの人へ伝播することが懸念されている (田村 2017; Smith *et al.* 2013; Graham *et al.* 2009; Price *et al.* 2005)。

OECD 加盟国での調査によると、畜産における家畜バイオマス重量 (Population correlation unit: PCU) 当たりの抗菌性物質使用量は豚が最も多く平均 172 mg/PCU、鶏が平均 148 mg/PCU、牛が平均 45 mg/PCU となっている (Van Boeckel 2015)。この傾向は日本でも同様で、2005 年から 2013 年の抗菌性物質販売量調査では豚が 442~499

mg/PCU、鶏が 87~124 mg/PCU、乳牛が 45~74 mg/PCU、肉牛が 40~64 mg/PCU であった（松田ら 2017）。抗菌性物質系統別では全家畜種でテトラサイクリンが最も多く、ペニシリン系やサルファ剤がそれに続くが、牛、特に乳牛においては豚や鶏でほとんど使用されていないセファロスポリン系の使用量も多い。また、投与経路別販売量では豚、鶏がほとんど経口投与であるのに対し、牛では経口投与は 6 割程度で注射薬の占める割合が大きく、乳牛では乳房内投与薬が 1 割程度を占めている（杉浦 2015）。このことは群管理が主体で飼料に混ぜて抗菌性物質を使用する頻度が多い豚、鶏に比べ、牛に対しては注射投与や乳房内投与など、個体診療で使用される抗菌性物質が多いことを示している。そのため、抗菌性物質使用量削減のためには他の畜種とは違ったアプローチが必要である。

乳房炎に対する抗菌性物質使用

乳牛においては成長促進の目的での抗菌性物質使用も行われてはいるが（Hughes *et al.* 2014; Herago *et al.* 2017）、臨床型および潜在性乳房炎、子宮炎、胎盤停滞、呼吸器病、運動器病などを含む感染症治療に主に使用され（Lhermie *et al.* 2018）、なかでも最も多く使われているのは乳房炎に対してである（Pol & Ruegg 2007; Oliver *et al.* 2011; Stevens *et al.* 2016; Loo *et al.* 2020）。また、泌乳期の終わりに抗菌性物質を乳房内投与する dry cow treatment (DCT) は多くの国で大部分の牛に対して行われており、抗菌性物質使用量を大きく引き上げる原因となっている（Brunton *et al.* 2012; Higgins *et al.* 2012; González

Pereyra *et al.* 2015; Swinkels *et al.* 2015; Stevens *et al.* 2016)。一般的に、乳房炎の治療にはβラクタム系、セファロスポリン系、アミノグリコシド系、テトラサイクリン系、フルオロキノロン系などの抗菌性物質が、乳房内投与および全身投与で用いられる (Loo *et al.* 2020)。このような抗菌性物質の過剰な乳房内投与は薬剤耐性菌の増加との関連が示唆されている (Saini *et al.* 2012 & 2013)。医療上重要な第3世代セファロスポリン系の抗菌性物質は、日本では乳房炎に対して認可された薬剤はないが、世界各国で使用されている (Wagner & Erskine 2013; Hockenhull *et al.* 2017)。セフトリオラムは ESBL 産生菌の増加の原因となりうると考えられており、実際に近年、乳牛から分離された *E. coli* などの腸内細菌において ESBL 産生菌の割合の増加が報告されている (Heider *et al.* 2009; Boireau *et al.* 2018)。また、フルオロキノロン系への耐性をもつ乳牛由来の *E. coli* の存在も報告されている (Duse *et al.* 2016; Yu *et al.* 2020)。これらの系統の抗菌性物質の薬剤耐性拡大は世界的な懸念事項であり、酪農における使用は検討されなければならない課題である。

乳房炎とバイオフィルム

牛の乳房炎は *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)、coagulase negative staphylococci (CNS)、*Streptococcus* spp.、*E. coli* などが主な起因菌である (Keane 2019)。乳房炎の症状や重篤度は罹患動物の健康状態や免疫系などを含む様々な要因に左右されるが、*Streptococcus uberis* (*S. uberis*) に代表される *Streptococcus* spp.、*S. aureus*、大腸菌群

などを起因菌とする乳牛の難治性乳房炎は、これらの菌のバイオフィルム形成能が難治化に関わっていると考えられている (Otto 2008; Bohl *et al.* 2020)。バイオフィルムとは特定の細菌がコロニーを形成する際につくられる構造体であり、浮遊した細菌が物質や組織表面に接着して細菌の密度が増加すると、菌体外多糖、細胞外 DNA やタンパク質など、バイオフィルムの主成分を産生するようになり、これらの成分に包まれながら細菌がさらに集合、増殖しバイオフィルムが成熟する (図 1) (Costerton *et al.* 1999)。生体内ではこの過程で抗菌性物質や免疫細胞の作用で大部分の細菌は死滅するが、一部はバイオフィルム内で **persister cells** という休眠状態のような形態で生き残り、抗菌性物質や免疫細胞に対して抵抗性を示すようになり、感染の慢性化や薬剤耐性菌の出現が誘発される (Lewis 2008)。バイオフィルム内の細菌が抗菌性物質に抵抗性を示すメカニズムとしては、バイオフィルム自体が分子フィルターとして抗菌性物質の浸透を防ぐこと、**persister cells** の増殖速度が非常に遅く増殖期に効果的な抗菌性物質が作用しにくいことや、バイオフィルム内の pH、 pO_2 、 pCO_2 などの微小環境の変化が抗菌性物質の活性を阻害することが考えられている (Dunne 2002)。また近年では、細菌同士が密度を感知して伝達物質によりコミュニケーションを行う **quorum sensing (QS)** とバイオフィルム形成および薬剤耐性獲得との関連が注目されている。QS は *Vibrio fischeri* の培養において、菌の増殖に伴って蛍光物質が産生されるという現象から発見された機構であり (Kaplan & Greenberg 1985)、その後様々な菌種で QS 関連遺伝子が発見されてきた (Lewis 2008)。

難治性乳房炎の代表的な菌である *S. aureus* においても QS がその病原性に関与していると考えられている (Singh & Ray 2014)。牛の乳汁由来の *S. aureus* や *E. coli* でも QS 関連遺伝子と病原性や薬剤耐性との関連が報告されており (Mahmmod *et al.* 2018; Yu *et al.* 2018)、乳房炎治療戦略において QS に関する研究は今後重要になると考えられる。上記のように、*in vitro* では乳房炎とバイオフィルムの関連が強く示唆されており、*in vivo* (牛の乳房内) で *S. aureus* のバイオフィルム成分の存在を検出した報告もあるため (Schönborn & Krömker 2016)、抗菌性物質を過剰に使用しないためにも、バイオフィルムの存在を念頭に置いた乳房炎対策が求められている。その1つとして近年、*S. aureus* のバイオフィルムおよび大腸菌群を標的とした乳房炎ワクチンが利用され始めており (Schukken *et al.* 2014)、乳房炎防除への効果が期待されている。

本研究の目的

本研究の主要な目的は薬剤耐性拡大防止のための抗菌性物質使用量低減である。第2章ではそのための第一歩として、日本国内で行われていなかった酪農における抗菌性物質使用の実態の調査が必要不可欠であると考え、千葉県内での調査研究を行った。抗菌性物質の種類や投与経路の影響をより詳細に反映させるため、有効成分重量ではなく Defined daily dose (DDD) 値を用いて集計した。

また、酪農において抗菌性物質使用量を増加させる最大の原因は乳房炎であるという考

えのもと、第 3 章ではバイオフィルム産生菌による慢性の難治性乳房炎に対する解決策としての新たな臨床技術の検討、第 4 章では乳房炎ワクチンの乳房炎発生抑制および抗菌性物質使用量低減効果の検討を目的として臨床現場での研究を行った。

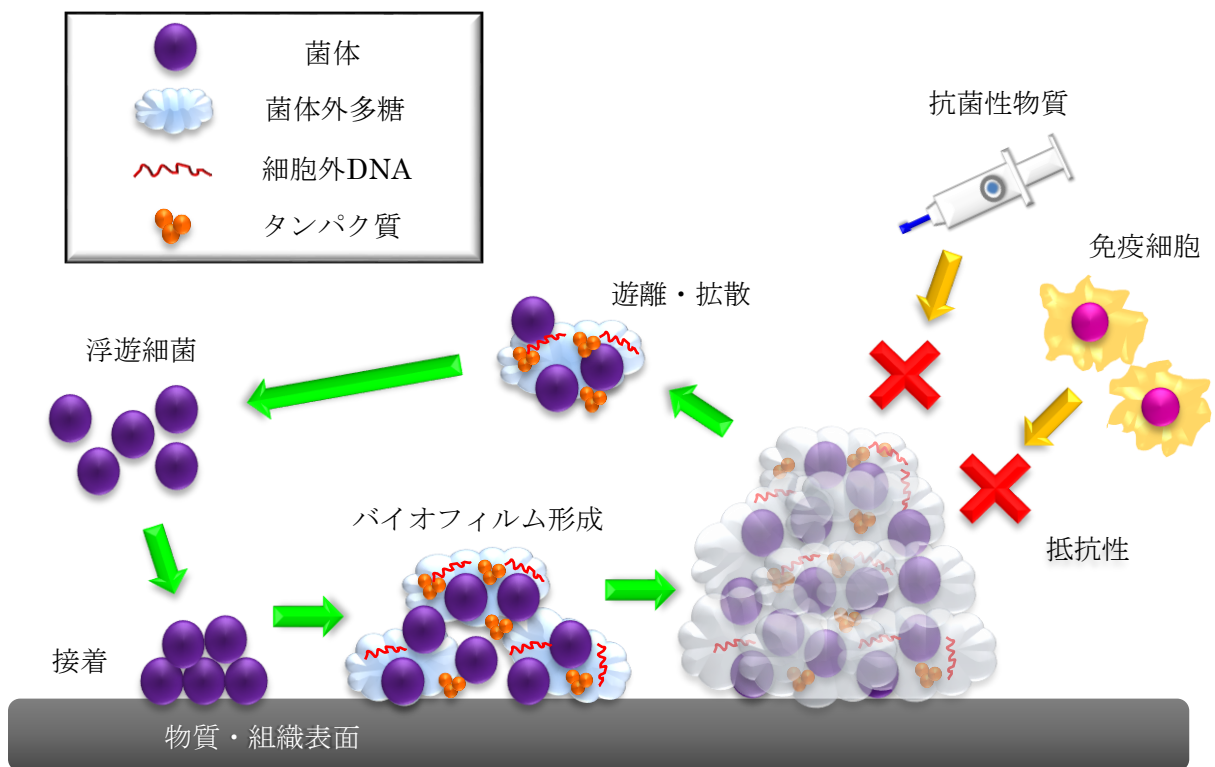


図1. バイオフィルム形成と抵抗性（模式図）

バイオフィルム形成能をもつ浮遊細菌が物質や組織の表面に接着し増殖すると菌体外多糖、細胞外DNA、タンパク質などの成分を分泌してバイオフィルムを形成し、抗菌性物質や免疫細胞の作用に抵抗性を示す。一部の細菌は遊離して再び浮遊細菌となり、別の場所へ拡散される。

第2章

日本版動物用 DDD 値 (Defined daily dose) を用いた千葉県内酪農家における

抗菌性物質の使用量評価

(5 年以内に出版予定)

第3章

乳牛の難治性乳房炎に対する高張食塩水による乳房内洗浄と

ショート乾乳を併用した治療

序 論

前章では乳房炎の治療が抗菌性物質使用量を増加させている主な要因であることが示された。本章では泌乳期の乳房炎に対する抗菌性物質使用量を増加させる要因の 1 つである難治性乳房炎の新たな治療法についての研究を行った。泌乳期の乳房炎は通常、有効な抗菌性物質を 1 クール 3 日間、搾乳時に乳房内投与する治療が実施されているが（乳房炎抗菌剤治療ガイドブック）、ショート乾乳は *Streptococcus spp.*などを起因菌とする慢性乳房炎に対して、罹患乳房の一時搾乳休止（3 日間）により乳房内の液性および細胞性免疫の作用を高めることを目的として行われる治療法である（図 6）（近藤ら 2013）。田中らは *S. uberis* による慢性乳房炎に対し、高拡散性カプリル酸モノグリセライドを基剤とするセフェム系乳房内注入薬を乳房内注入した上でのショート乾乳が有効であったと報告しているが、薬剤感受性があるにもかかわらずショート乾乳で治癒しなかった症例も存在し、*S. uberis* の強いバイオフィーム形成能がその一因であるとしている（田中ら 2017）。また、乳房内洗浄は主に大腸菌群による急性乳房炎（acute coliform mastitis : ACM）に対して乳房内の菌数およびエンドトキシンを減少させ症状の増悪を防ぐ目的で行われる（Shinozuka *et al.* 2009）。本研究では、*in vitro* で *S. aureus* などのバイオフィームに 1 M 以上の濃度の NaCl を 10 分以上曝露させることでバイオフィームを分解する効果が高いとの Chiba らの報告（Chiba *et al.* 2014）をもとに、乳房内に形成されたバイオフィームを高濃度の食塩水による乳房内洗浄により分解・除去することができれば抗菌性物質の治療効果やショート乾乳

による免疫細胞の機能が增強されるという仮説を立てた（図 7）。本研究では、高張食塩水で乳房内洗浄を行った後にショート乾乳を実施する治療法を考案し、難治性乳房炎に対する治療効果を検討した。また、この治療法のバイオフィルム分解効果を検証する目的で、治療後の個体の乳汁細菌検査や血液検査による経時的な追跡および乳汁中のバイオフィルムの検出試験を行った。また、対象動物から分離された乳房炎起因菌のバイオフィルム形成能とその高張食塩水による分解効果の検証のため、microtiter plate 法で *in vitro* の実験を試みた。

材料と方法

1. 高張食塩水による乳房内洗浄とショート乾乳を併用した治療の効果

調査期間および対象農家：千葉県農業共済組合西部家畜診療所管内 55 酪農家のうち、2017 年 1 月～2017 年 9 月に難治性乳房炎の発生があり試験内容に同意が得られた 16 酪農家を対象農家とした。全身症状を伴わない慢性乳房炎を呈し、細菌分離培養にて起因菌を同定した分房で、薬剤感受性に基ついた泌乳期用乳房炎軟膏による通常の治療を 3 日間×3 クール以上実施、またはショート乾乳を実施したにも関わらず治癒しなかったものを難治性乳房炎罹患分房と定義した。

対象動物および分房：対象農家で飼養され、難治性乳房炎に罹患したホルスタイン種雌牛 42 頭、計 50 分房を対象とした。

1) 乳房内灌流液中の NaCl 濃度の検証

予備試験として、高張食塩水（高張食塩注®、共立製薬、NaCl 濃度 5.85%、約 1.23 M）または生理食塩水（動物用生食 V 注射液®、日本全薬工業、NaCl 濃度 0.9%、約 0.15 M）による 4 回の連続した乳房内洗浄（各回 250 mL 注入）における灌流液中の NaCl 濃度を測定した（各 n=1）。灌流液は 200 mL を排出した直後に 50 mL を回収し、電解質分析装置 EX-Z（株式会社常光）を用いてイオン電極法で測定した Na イオン濃度から NaCl 濃度を算出した。

2) 高張食塩水による乳房内洗浄を併用したショート乾乳

以下の手順で実施した。

- （1）罹患乳房内の乳汁を十分に排出した。
- （2）試験群（n = 38）では高張食塩水、対照群（n = 12）では生理食塩水を、プラスチック製導乳管（ミルクカニューラ®、(株)川崎生物科学研究所）および動物用輸液用チューブ（動物用補液セット®、日本全薬工業）を用いてそれぞれ 250 mL を罹患乳房内注入後、10 分間静置した（図 8 参照）。
- （3）乳房内から排液した後、計 1 L を使い切るまで 3 回乳房内洗浄を繰り返した。なお、初回の乳房内灌流液のうち 200 mL 排出後の 10 mL を滅菌スピッツ管で回収し、後述の塗抹標本作製に用いた。
- （4）乳房内洗浄終了後、セファゾリン乳房注入薬（セファメジン Z®、日本全薬工業、以

下セファメジン Z®) を注入しショート乾乳を実施した。

3) 乳汁細菌分離培養と治癒判定

処置実施日を 0 日として、処置 3、7、14、21 日後で採材した乳汁 10 μ L をクロモアガーオリエンタシオン培地に塗抹し、細菌分離培養検査およびコロニー数の計測を行った。処置 21 日後で乳汁から乳房炎起因菌が分離されなかったものを治癒と判定した。なお、*S. uberis* 以外の *Streptococcus* spp. (Other streptococci: OS) については菌数 250 個/mL 未満を治癒とした。

4) 試験群内での個体情報の比較：試験群をさらに治癒した群（効果あり群、n = 27）と治癒しなかった群（効果なし群、n = 11）に分け、処置 0 日における年齢、分娩後日数および乳頭ロスコア（1 から 4）を調査し、慢性炎症の指標として血清中 TP（総蛋白）および A/G（アルブミン/グロブリン）比を測定した。なお、試験群において同一個体で複数分房を処置した場合、乳頭ロスコア以外の項目では全分房が治癒した個体を効果あり群（n = 22）、治癒しない分房があった個体を効果なし群（n = 11）として比較した。

5) 免疫動態の解析

試験群（n = 3）、対照群（n = 3）において処置 0 日、3、7、14、21 日後に採血を行い、末梢血白血球細胞構成をフローサイトメーターにて解析した。解析は白血球表面抗原である CD4、CD8、CD14、CD21、CD335、WT1 に対する抗体を使用した。

6) 乳房内灌流液中のバイオフィルムの評価

Kajiyama らの方法 (Kajiyama *et al.* 2009) を改変し、乳房内灌流液中のバイオフィルムの定量評価を行った。*S. uberis* または OS が検出された個体 (試験群 n = 3、対照群 n = 3) において、初回の乳房内灌流液 10 mL を遠心分離 (7,000 rpm、10 分間) 後上清を捨て、沈渣を生理食塩水で 2 mL に希釈した溶液 10 μ L をスライドグラス上に塗抹 (10 mm \times 10 mm) 後、火焰固定し、1%クリスタルバイオレット溶液 (Hacker 氏液) で 5 分間染色した。顕微鏡 (1,000 倍) にてランダムに 15 視野を撮影し、画像処理ソフト ImageJ® (Wayne Rasband (NIH)) にて解析を行い、バイオフィルム領域の占める面積を計測した (図 9)。

1.3 統計解析

統計処理は統計ソフト Statcel2 (オーエムエス出版、埼玉) を用い、乳汁中細菌数の経時変化の比較には多重比較検定 (Steel の方法)、治癒率については Fisher の正確確率検定、試験群の効果あり群と効果なし群の比較には Welch の t 検定、Wilcoxon の順位和検定を用いた。全ての統計処理において $p < 0.05$ を有意とした。

2. Microtiter plate でのバイオフィルム形成実験

Merritt らおよび O'Toole の方法を改変し、*in vitro* で microtiter plate でのバイオフィルム形成実験を行った (Merritt *et al.* 2005; O'Toole 2011)。

クロモアガーオリエンタシオン培地 (関東化学) で発育した臨床型乳房炎の乳汁由来の *S. aureus* 4 株および *S. uberis* 4 株の 1 コロニーを 5 mL の BHI 培地 (brain heart infusion broth、ニッスイ) に接種後、37°C、overnight で振とう培養した。Geoghega らおよび Dieser

らの方法を参考に、培養液を *S. aureus* は BHI+1% glucose、*S. uberis* は BHI+1% sucrose で 1/100 希釈し、96 well 平底ポリスチレンプレート (F8 Maxisorp Nunc-immuno Module 468667、Thermo Scientific™) に 100 μ L ずつ分注しプレートシールで密閉後、37°C で 48 h 培養した (Geoghegan *et al.* 2010; Dieser *et al.* 2017)。その後浮遊細菌除去のためデカントで上清を捨て、蒸留水を満たしたバットに静かに浸し 3 回洗浄した。洗浄水を除去し 0.1% クリスタルバイオレットを 125 μ L 加え、10 分室温で静置した後、同様に蒸留水で 3 回洗浄、水分除去し、60 分風乾させ、バイオフィーム形成を目視で確認した。

結 果

1. 高張食塩水による乳房内洗浄とショート乾乳を併用した治療の効果

予備試験の結果、高張食塩水を用いた乳房内洗浄の灌流液中では 4 回全てで 1 M 以上の NaCl 濃度が保たれていた (表 4)。

本研究で対象となった罹患乳房の乳汁中細菌数の推移を図 10 に示した。処置 0 日と比較して対照群では処置 3 日後のみ、試験群では処置 3 日後以降すべての日で有意な減少がみられた。検出された乳房炎起因菌および治癒率は表 5 のとおりである。菌種は *S. uberis* が最も多く、菌種別の治癒率では、試験群の *S. uberis* における治癒率は 87.0% (20/23) であった。全菌種合計の治癒率は試験群で 71.1% (27/38) となり、対照群の 33.3% (4/12) と

比較して有意に高かった (表 5) ($p < 0.05$)。

試験群内で治癒した個体または分房 (効果あり群) と治癒しなかった個体または分房 (効果なし群) の個体情報を比較した結果、年齢 (5.05 ± 1.74 vs 5.81 ± 1.15)、分娩後日数 (180.4 ± 162.3 vs 190.7 ± 100.7) では有意差はみられなかったが、乳頭口スコア (2.00 ± 0.78 vs 2.73 ± 0.79 、 $p < 0.05$) は効果あり群で有意に低値であった (表 6)。また有意ではないが効果なし群で TP が高く、A/G 比が低い傾向であった (表 6)。

免疫動態の解析では、両群で処置 3 日後に末梢血中の CD14 (単球・マクロファージのマーカー) 陽性細胞率が増加する傾向がみられた (図 11)。その他の抗原に関しては異常値がみられ信頼性が低いため、データは記載しない。

乳房内灌流液の塗抹では、バイオフィルムの占める面積は試験群 $20.8 \pm 12.2\%$ 、対照群 $13.6 \pm 7.6\%$ となり、試験群で有意に高値を示した ($p < 0.05$) (図 12)。

2. Microtiter plate によるバイオフィルム形成実験

96 well プレート上で、*S. aureus* および *S. uberis* 全ての株でバイオフィルムの形成が確認されたが、well によって形成の程度にばらつきがみられた (図 13)。

考 察

バイオフィルム産生能を有する細菌は、菌体が抗菌性物質の作用や白血球の貪食作用や種々のサイトカインなどの影響を受けにくくなるため、薬剤使用量の増加やさらなる耐性

菌出現の原因となると考えられている (Otto 2008)。ヒト医療の分野では医療機器表面や歯科領域などでのバイオフィルム感染症が古くから問題視されているが (水之江 2013; Huang *et al.* 2011)、牛の乳房炎においても *S. uberis* や *S. aureus* のようにバイオフィルム形成能を有する病原菌が多数存在することが知られ、近年注目を集めている (Otto 2008)。そのため難治性の乳房炎に対してはバイオフィルムを標的とした治療や予防が求められており、*S. aureus* のバイオフィルムを標的としたワクチンなどはその一例である (Schukken *et al.* 2014)。今回検出された乳房炎起因菌は個別にバイオフィルム形成能を評価してはいないが、いずれの菌種も *in vitro* でのバイオフィルム形成が報告されている (Tang *et al.* 2009; Gomes *et al.* 2016)。

本研究ではバイオフィルムの関与が疑われる難治性の乳房炎に対して高張食塩水を用いた乳房内洗浄とセファゾリン乳房注入薬を用いたショート乾乳を併用することにより高い治療効果を得ることができた。また、試験群には過去に通常のショート乾乳を行ったが治癒しなかった個体が 3 頭含まれており、いずれも本法で治癒に至ったことは特筆すべき結果であり、高張食塩水による乳房内洗浄の有効性を示唆している。今回は難治性で長期の抗菌性物質治療を必要とすることが多い *S. uberis* (Hillerton & Kliem 2002) および OS を中心に試験を行ったが、泌乳期での治療が難しい *S. aureus* (Barkema *et al.* 2006) や乳腺細胞深部に感染し慢性化しやすい *Klebsiella* spp. (篠塚 2015) でも少数例ながら効果のみられた個体があったことは興味深く、今後はこれらの菌種でも症例数を重ねていきたい。

高張食塩水によりバイオフィルムが分解される原理については、*Chiba*らは、バイオフィルム内のイオン結合の破綻によるものと推察している (*Chiba et al. 2014*)。一般に細菌の菌体表面は大部分が負に荷電しており、バイオフィルムの構成成分である菌体外多糖、タンパク質、細胞外 DNA などとも正か負に荷電しているため、ファンデルワールス力や疎水結合なども存在するものの、イオン結合のバイオフィルム形成への寄与は大きい。そのため、高濃度の Na イオン、Cl イオンの電荷により菌体とバイオフィルム成分のイオン結合の解離が起こり、バイオフィルムが分解されると考えられる。

海水療法にみられるように高濃度食塩水の治療効果は古くから認識されており (*Gauvain 1935*)、近年ではヒトのアトピー性皮膚炎に高濃度の塩水浴と紫外線の併用療法が有効であるとする報告もある (*Heinlin et al. 2011*)。しかしながら、ヒトの耳鼻科領域で高張食塩水での洗浄が副鼻腔炎などの治療において有効であるという報告はあるものの (*Kanjanawasee et al. 2018*)、これは鼻腔粘膜上皮のクリアランスを目的とした治療であり、バイオフィルム感染症に高張食塩水が有効であるというエビデンスは現時点では無い。獣医療分野においても高張食塩水を輸液以外の目的で細菌感染症治療に用いた直接の報告は無く、本研究によりバイオフィルム感染症に対する新たな治療法として高張食塩水が活用できる可能性を示すことができた。またショート乾乳を併用することで、通常の乳房内注入薬による治療よりも抗菌性物質の使用量を大幅に削減でき、さらに生乳出荷禁止期間も短縮されるというメリットもあり、今後普及していきたい手法である (図 6 参照)。ただ、

試験群内においては、治癒した分房では治癒しなかった分房よりも平均の乳頭口スコアが低く、治療効果に影響した可能性が示唆された。本治療法を効果的に実施する前提として、適切な搾乳衛生、搾乳手技を心がけ、乳頭の状態を健康に保つことが重要である。また TP および A/G 比は、治癒しなかった個体は治癒した個体に比べて有意差はなかったものの TP が高く A/G 比がやや低い傾向にあったことから、慢性炎症がより進行し乳房内の膿瘍形成や器質化が起きており治療に反応しなかった可能性も考えられる。血液検査以外にも超音波画像診断装置により非侵襲的に乳房内の炎症を評価することが可能であり (Franz *et al.* 2009)、本治療法の適用の可否を判断する上で有用であると考えられる。

近藤らは慢性の *Streptococcus* 乳房炎に対してショート乾乳を実施したところ、搾乳休止 3 日目で乳汁中のラクトフェリンおよび IgG 濃度が上昇し、免疫が賦活されることで良好な治療成績を得たとしている (近藤ら 2013)。本研究における免疫動態の解析でも、サンプル数および有効なデータが少なかったものの、試験群、対照群ともに処置 3 日後に末梢血中 CD14 陽性細胞が増加しその後低下する傾向がみられ、ショート乾乳による免疫細胞の誘導が示唆された。しかしながら処置 3 日後以降の乳汁中細菌数は試験群の方が減少する傾向がみられたことから、高張食塩水によりバイオフィルムが分解されたことで、ショート乾乳の作用がより増強された可能性が考えられる。予備試験の結果も考慮すると、本手法の手技によって乳房内を高濃度 (1.0 M 以上) の NaCl に長時間 (10 分間以上) 曝露できたことが効果的であったと推察される。(尚、現在は乳房内洗浄の方法を本研究のものより

改変して実施しており、高張食塩水を 1 回目に 500 mL 程度注入している。その後の手順は同様)。

一方で、牛の乳房内でバイオフィルムを直接検出したという報告は非常に少なく、本研究においても乳房内のバイオフィルムが分解されたことを示す直接的なデータは得られなかった。Pedersen はクリスタルバイオレットの吸着量とバイオフィルムの乾燥重量が相関することを報告している (Pedersen 1982)。本研究でも乳房内灌流液の塗抹画像においてクリスタルバイオレットで染色された領域を測定することにより高張食塩水によるバイオフィルムの分解効果の間接的な定量を試みた。ただ、生理食塩水を用いた対照群でもある程度の染色領域があり、検出されたバイオフィルムが高張食塩水の分解効果によるものなのか、乳房内洗浄により物理的に剥離されたものなのかを判別することはできなかった。用いたサンプル数が少ないこと、またサンプルごとに処置時の乳汁中細菌数が異なることなどもあり、客観性に欠けるデータであった。乳房内バイオフィルムの分解効果の検証は今後の検討課題であり、その方法の 1 つとして microtiter plate 法で乳房炎起因菌のバイオフィルムを形成させ、*in vitro* での高張食塩水によるバイオフィルム分解効果を検証する実験を計画している (図 14)。本研究中ではプレート上でバイオフィルムの形成を確認することはできたが、同一株でも well ごとの形成量のばらつきが大きく、上記の実証実験には至らなかった。培地の組成や培養条件などの検討も必要かもしれないが、今回用いたプレートは培養液の吸引や洗浄の際にバイオフィルムが一部除去される可能性があり、近年では平底プレ

ートではなく Ceri らが開発した Calgary biofilm device (現在は商品名 MBEC Assay®、innovotech) (Ceri *et al.* 1999)、を用いて *S. aureus* などのバイオフィルムへの薬効を検証する研究が多く報告されている (Molina-Manso *et al.* 2013; Dalecki *et al.* 2016; Jaśkiewicz *et al.* 2019)。これは 96 well プレーットの蓋に 96 本のポリスチレン製 peg が付いており、培養液に触れている peg 上にバイオフィルムを形成させる装置であり、より均一なバイオフィルム形成が可能で、培養液の交換も容易であるため、最小バイオフィルム撲滅濃度 (MBEC) の測定などに適している (図 15 参照)。最近では日本でも同様の製品が発売され利用されており (Tsukatani *et al.* 2016)、今後はこの方法での実験も検討しつつ、本治療法の効果を裏付けるための更なる研究が必要であると考ええる。

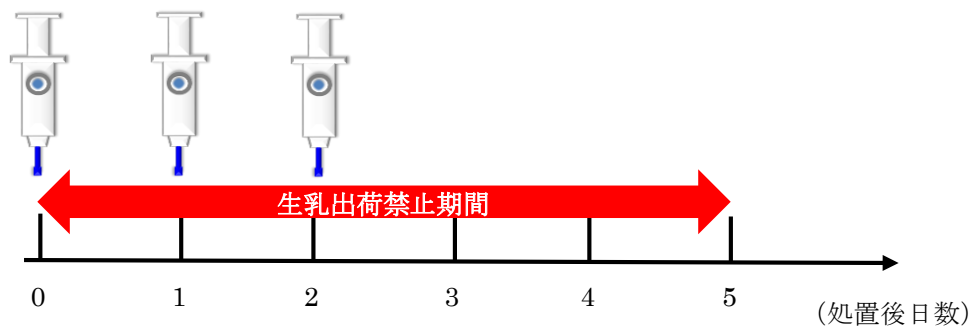
最後に、今後の展望としては慢性乳房炎だけではなく大腸菌群による急性乳房炎 (ACM) に対しても、高張食塩水による乳房内洗浄が応用できないかと考えている。ACM はバイオフィルム形成により再発、慢性化する可能性が考えられている (篠塚 2015) が、急性期の初期治療として高張食塩水を作用させることでバイオフィルム形成を阻害し乳腺組織への菌の定着を防ぐ効果が期待されるため、これから検証していきたい。

小 括

長期間にわたる抗菌性物質治療を必要とする慢性乳房炎にたいして、高張食塩水を用いた本治療法は対照群よりも有意に治癒率が高く、その有効性が確認された。乳房内のバイオフィルム分解効果についてはさらなる研究により実証する必要があるが、バイオフィルム感染症治療の新たな可能性を示すことができた。また、抗菌性物質の使用量を削減する上では有用な方法であると考え。次章では、ワクチネーションにより乳房炎の発生および重症化を制御するための研究を報告する。

通常の治療（1クール）

抗菌性物質の乳房内投与（3日間）



ショート乾乳による治療

抗菌性物質の乳房内投与（1回のみ）

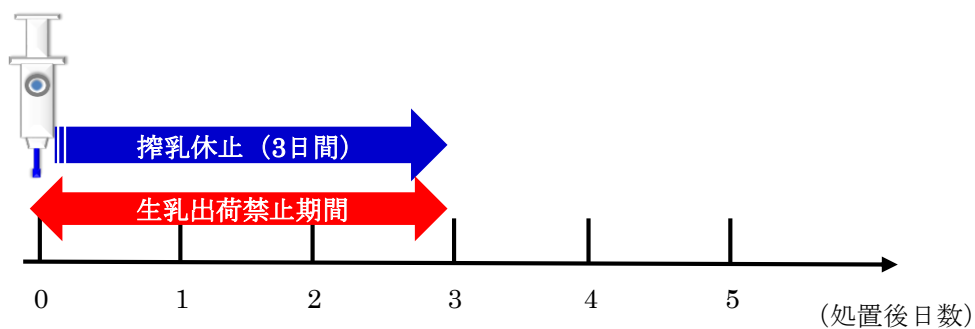
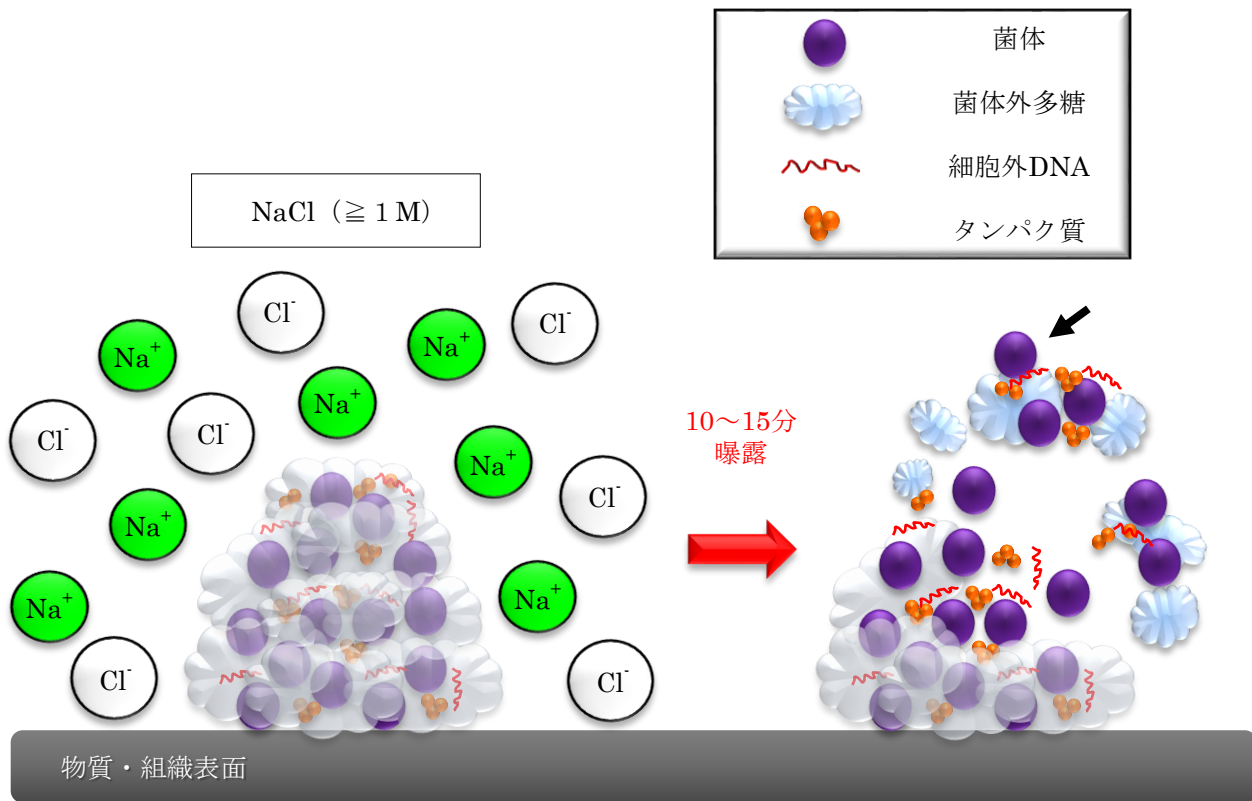


図6. 泌乳期乳房炎の通常の治療とショート乾乳による治療

泌乳期乳房炎の通常の治療（上図）は搾乳時に1日1回、3日間の抗菌性物質乳房内投与を行い、最終の投与から3日間（セファゾリン使用の場合）、生乳としての出荷が禁止される。ショート乾乳による治療（下図）では抗菌性物質を1回のみ乳房内投与した後3日間罹患分房の搾乳を休止し、その後は通常の搾乳を行う。生乳出荷禁止期間は2日短縮される。



(Chiba *et al.*, 2015をもとに作成)

図7. 高濃度NaClによるバイオフィルムの分解の仮説 (模式図)

1 M以上の高濃度のNaClに10から15分暴露することでバイオフィルムが分解され、菌体 (矢印) が露出する。

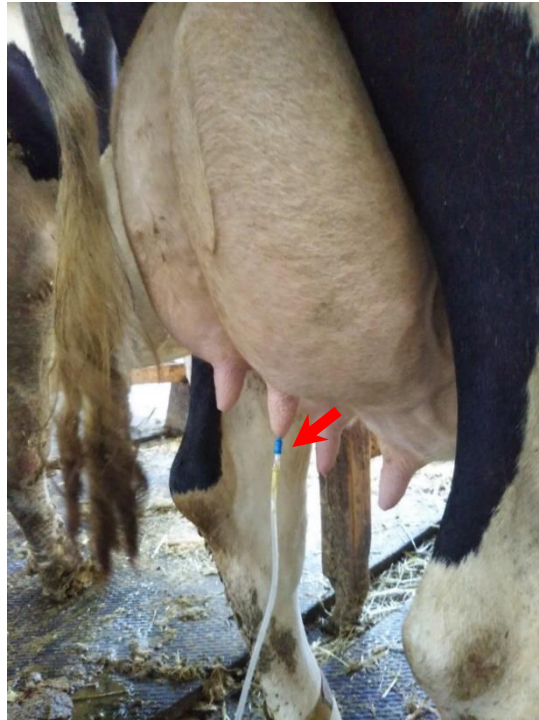


図8. 乳房内洗浄の手技

プラスチック製導乳管（矢印）に動物用輸液用チューブを接続して乳房内に高張食塩水を注入している様子。250 mL注入した後10分間静置し、輸液用チューブのみを外して乳房内灌流液を排出した。

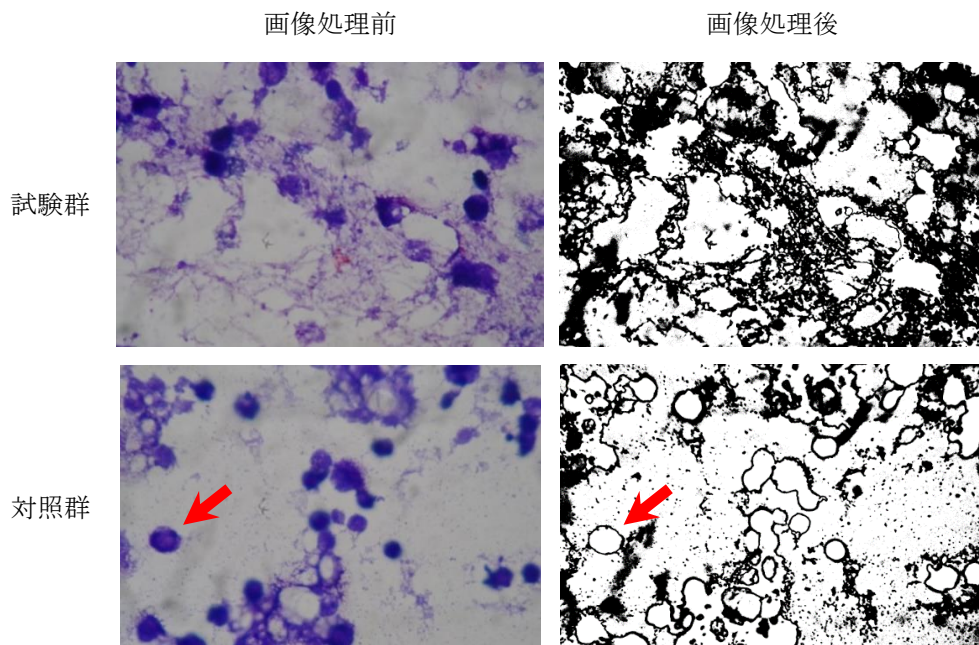


図9. 乳房内灌流液中のバイオフィルムの評価

処置0日目において、試験群では高張食塩水、対照群では生理食塩水をそれぞれ250 mL 乳房内に注入して10分間静置した後、灌流液の初めの200 mLを捨て、10 mLを塗抹標本用に回収した。試験群および対照群の乳房内灌流液の塗抹を1%クリスタルバイオレット染色し、光学顕微鏡で観察した（×1000）。撮影した画像をImageJ®で画像処理し、細胞核（矢印）などを除いたバイオフィルム領域のみ抽出した。

表4. 乳房内灌流液の浸透圧（予備実験）

	試験個体	対照個体
Pre（乳汁）	161 mM	ND
1回目	1,176 mM	154 mM
2回目	1,123 mM	154 mM
3回目	1,143 mM	153 mM
4回目	1,118 mM	147 mM

試験個体では高張食塩水（NaCl濃度5.85%、約1.23 M）、対照個体では生理食塩水（0.15 M）による4回の連続した乳房内洗浄（各回250 mL注入）における灌流液中のNaCl濃度を測定した（各n = 1）。灌流液は200 mLを排出した直後に50 mLを回収し、イオン電極法で測定したNaイオン濃度からNaCl濃度を算出した。

ND : no data

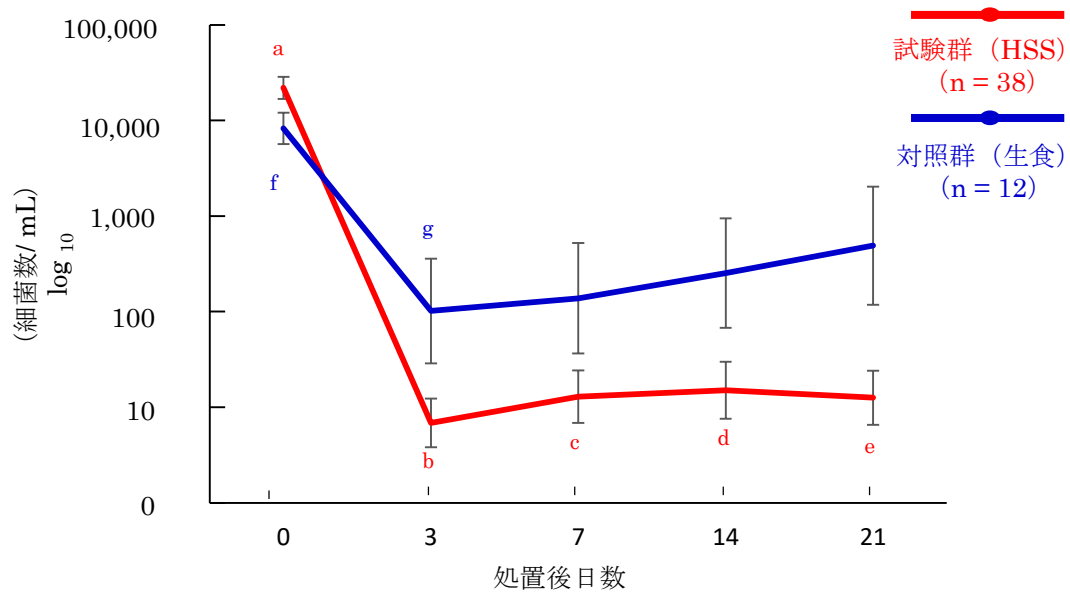


図10. 乳汁中細菌数の推移

処置0日に試験群 (n = 38) では高張食塩水 (HSS)、対照群 (n = 12) では生理食塩水 (生食) を用いて乳房内洗浄を行った後、セファメジンZ®を乳房内注入してショート乾乳 (3日間の搾乳休止) を行った。処置後0日 (処置する直前)、3日、7日、14日、21日の搾乳時に採材した乳汁 10 μ L をクロモアガーオリエンタシオン培地に塗抹し、細菌分離培養検査および細菌数の計測を行った。細菌数は対数変換し平均値 \pm SE で示した。

a-b、a-c、a-d、a-e、f-g : p < 0.05

(処置0日を対照とした多重比較検定・Steelの方法)

表5. 検出された菌種と治癒率

	試験群	対照群
<i>S. uberis</i> (n = 29)	87.0% (20/23)	50.0% (3/6)
OS (n = 10)	50.0% (3/6)	25.0% (1/4)
<i>S. aureus</i> (n = 7)	33.3% (2/6)	0% (0/1)
<i>Klebsiella</i> spp. (n = 2)	100.0% (2/2)	ND
<i>Enterococcus</i> spp. (n = 2)	0% (0/1)	0% (0/1)
全菌種合計 (n = 33)	71.1% (27/38) ^a	33.3% (4/12) ^b

() 内は分房数、a-b : $p < 0.05$ (Fisherの正確確立検定)

ND: no data

OS: Other streptococci (*S. uberis*以外の*Streptococcus* spp.)

表6. 試験群の概要（処置0日での数値）

	治癒	効果なし
年齢（歳）	5.05±1.74 (n = 22)	5.81±1.15 (n = 11)
分娩後日数（日）	180.4±162.3 (n = 22)	190.7±100.7 (n = 11)
乳頭口スコア	2.00±0.78 ^a (n = 27)	2.73±0.79 ^b (n = 11)
TP (g/100 mL)	7.77±0.62 (n = 22)	8.34±0.85 (n = 11)
A/G比	0.82±0.20 (n = 22)	0.74±0.22 (n = 11)

平均値±SD, a-b : $p < 0.05$ (Welchのt検定)

TP : 血清中総蛋白、A/G比 : 血清中アルブミン/グロブリン比

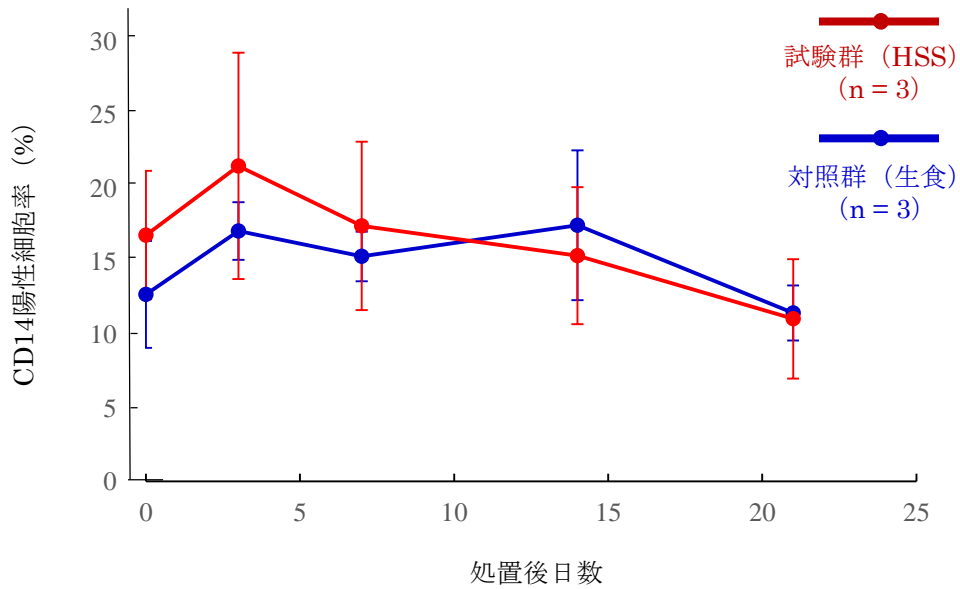


図11. 処置後の免疫動態

処置0日に試験群では高張食塩水 (HSS)、対照群では生理食塩水 (生食) を用いて乳房内洗浄を行った後、セファメジンZ®を乳房内注入してショート乾乳 (3日間の搾乳休止) を行った。各群3頭で処置後0日、3日、7日、14日、21日で採血を行い、フローサイトメトリーにて末梢血単核球中のCD14陽性細胞率を計測した (平均値±SE)。

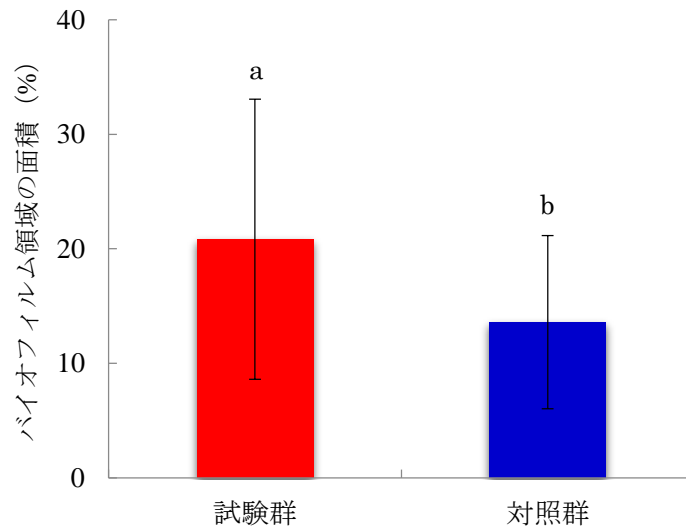


図12. バイオフィーム領域の面積の比較

S. uberis または Other streptococci (*S. uberis* 以外の *Streptococcus* spp.) が検出された試験群 (高張食塩水投与群)、対照群 (生理食塩水投与群) 各3頭で、初回の乳房内灌流液の塗抹標本を作製し、1%クリスタルバイオレットで染色した。顕微鏡 (1000倍) にてランダムに選んだ15視野を撮影し、画像処理ソフトImageJ®でバイオフィルム領域の視野中に占める面積 (%) を算出した (15視野の平均値±SD)。a - b間: $p < 0.05$ (Welchのt検定)

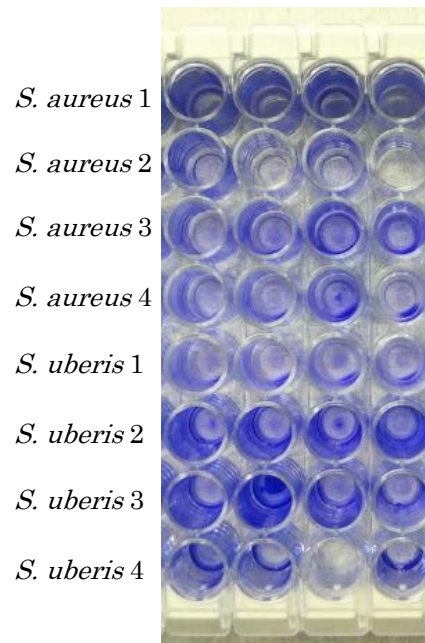


図13. Microtiter plate法によるバイオフィーム形成試験

乳房炎乳汁から分離した*S. aureus* 4株、*S. uberis* 4株を用いて、96 well平底ポリスチレンプレート上で4 wellずつバイオフィームを形成させ、1%クリスタルバイオレットで染色し、洗浄後乾燥させた（各段は全て同一株）。全株でバイオフィームの形成が確認されたが、同一株でもwellごとのばらつきがみられた。

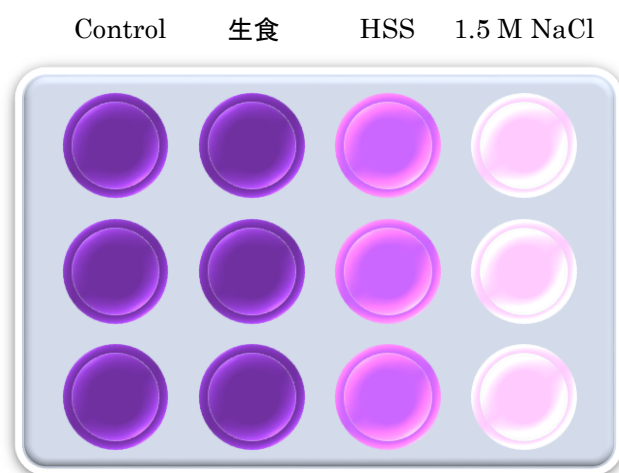
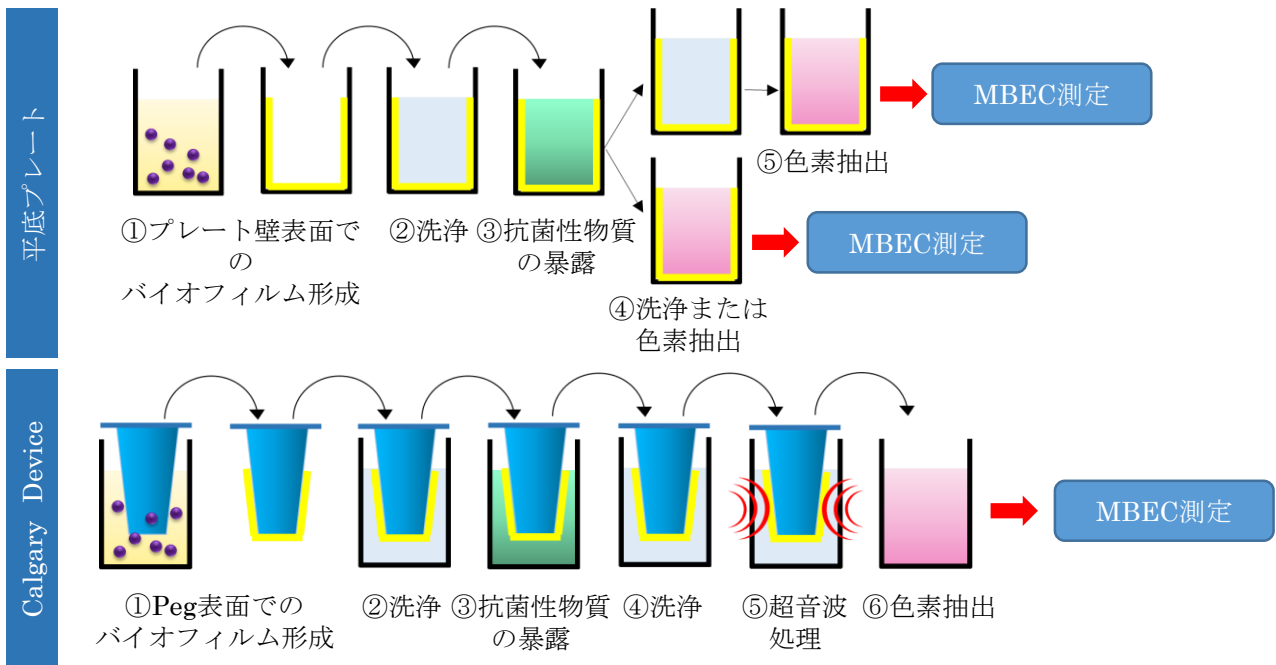


図14. *In vitro*での高張食塩水（HSS）の効果の検証実験（模式図）

96 well平底ポリスチレンプレートに形成されたバイオフィルムに蒸留水（Control）、生理食塩水（生食、約0.15 M NaCl）、HSS（約1.23 M NaCl）、1.5 M NaClを10~15分作用させ、蒸留水で洗浄した後、1%クリスタルバイオレットで染色し、吸光度を測定する（波長570 nm）。



Jaśkiewicz *et al.* (2019) の図を改変

図15. 平底プレートとCalgary biofilm deviceでのバイオフィーム形成実験の比較
 平底プレート（上図）ではWellの底および壁表面でバイオフィームが形成されるのに対し、Calgary Device（下図）では蓋に付着したPeg表面の培養液に接した部分にバイオフィームが形成されるため、プレートを交換することでより簡便に洗浄や抗菌性物質の暴露を行うことができる。

第4章

二価不活化乳房炎ワクチンをもちいた乳房炎防除

序 論

乳房炎は発症すると乳量および乳質の低下による利益の損失だけでなく、抗菌性物質などによる治療費の増加、薬剤使用による生乳出荷禁止期間中の飼料代、乳廃棄による損失、作業時間の延長などが生じるほか、重症化・慢性化した場合には牛は淘汰対象となりやすいことから、酪農において最も経済的損失の大きい疾病と考えられている (Seegers *et al.* 2003; Huijps *et al.* 2008)。 *S. aureus* は牛の乳房炎の主要な起因菌であり、牛群内で伝播し複数の牛に潜在性または慢性乳房炎を引き起こす (Sears & McCarthy 2003)。臨床症状は比較的軽い場合が多いものの、泌乳期中の抗菌性物質治療による治癒率は 12～50%程度と低く (Gruet *et al.* 2001; Petersson-Wolfe *et al.* 2010)、これは *S. aureus* のバイオフィーム形成能や細胞内にも侵入し生存できるという特性によるものと考えられている (Gomes *et al.* 2016)。一方、*E. coli* や *Klebsiella* 属など大腸菌群による急性乳房炎 (ACM) はグラム陰性菌の細胞壁の構成成分であるリポ多糖 (LPS) が内毒素として引き起こすエンドトキシンショックにより甚急性に重篤化するケースがしばしばあり、迅速な診断と適切な治療を行わなければ死亡や淘汰の原因となる (Hogan & Larry Smith 2003)。大腸菌群もバイオフィームの形成能が確認されており、急性だけでなく慢性乳房炎となり再発するものもある (Gomes *et al.* 2016)。これらの起因菌による乳房炎は通常の抗菌性物質治療のみでは完全な対処が難しく、近年ワクチンによるコントロールが注目されている。2016 年より *S. aureus* および CNS と大腸菌群を標的とした二価不活化乳房

炎ワクチン（スタートバック®、共立製薬株式会社）が日本では初めての乳房炎に対するワクチンとして発売された。このワクチンには *S. aureus* SP140 株と *E. coli* J5 株を不活化したものと油性アジュバンドが含まれる。新しいワクチンであるため国内では効果を検証した報告はほとんどないが、大腸菌群だけでなく難治性の *S. aureus* の乳房炎の予防に有用であると考え、診療所管内の 1 酪農家で二価不活化乳房炎ワクチンを 2017 年 6 月より投与開始しその有用性を検討した。効果の評価として、乳房炎にかかった診療コスト診療回数およびバルク乳体細胞数を、ワクチン使用開始前の 2015 年、2016 年との比較を行った。

材料と方法

2015 年 8 月から 2018 年 2 月まで、千葉県農業共済組合西部家畜診療所管内 1 酪農家（タイスツール牛舎、搾乳牛 65 頭、育成牛 11 頭を飼養）において調査を行った。診療所管内で同期間にスタートバック®ワクチンの使用を開始した酪農家は 3 戸あったが、うち 2 戸はワクチン接種情報、抗菌性物質使用量、乳成分や乳房炎の細菌検査などの記録が不十分であったため除外した。診療記録から、各年度で 8 月から翌年 2 月における分娩前 30 日から分娩後 60 日における乳房炎発生頭数、乳房炎の原因菌、バルク乳体細胞数、乳房炎と診断された診療 1 件（発病から転帰まで）当たり診療点数（1 点は 10 円に相当）とのべ診療回数（往診した回数）について調査した。また、本農家の 2014 年から 2018 年における抗菌性物質使

用量から、Total Treatment Days および投与経路別 Treatment Days を算出した（方法は第 2 章 24、25 頁参照）。スタートバック®ワクチン投与は 2017 年 6 月から開始し、分娩予定表をもとにワクチンの用法に従い、全頭に順次分娩予定日前 45 日と 10 日前および分娩後 52 日の計 3 回投与した。

統計解析は統計ソフト Statcel2（オーエムエス出版、埼玉）を用い、分娩前 30 日から分娩後 60 日の乳房炎の発生頭数においてはカイ二乗検定を用い、バルク乳の体細胞数においては多重比較検定（Scheffe 法）にて比較検討した。全ての統計解析において $p < 0.05$ を有意とした。

結 果

各年度 8 月から翌年 2 月における分娩頭数に対する乳房炎発生率は 2015 年度は 55.6% (20/36)、2016 年度は 61.7% (29/47)、2017 年度は 41.7% (15/36) であった（表 7）。いずれの年度間も有意な差は認められなかったが、2017 年度の 8 月から 2 月における臨床型乳房炎発生率は 2015 年度、2016 年度と比べて低値であった。

原因菌種別乳房炎発生頭数は *S. aureus*、OS、*Klebsiella. spp* が 2015 年度、2016 年度に比べ 2017 年度で少ない傾向だった。逆に CNS は 2015 年度、2016 年度に比べ 2017 年度で多い傾向だった（表 8）。バルク乳の平均体細胞数は 2015 年度の 178,400 個/mL と比較して、2016 年度は 154,500 個/mL、2017 年度は 126,100 個/mL と、毎年減少してお

り、特に 2017 年度は 2015 年度と比べて有意に減少した（図 17）。

乳房炎と診断された診療 1 件当たりの診療点数は 2015 年度 1,007 点、2016 年度 1,313 点、2017 年度 770 点、また診療のべ診療回数は、2015 年度 121 回、2016 年度 166 回、2017 年度 84 回であり、いずれも 2017 年度は他の年度に比べて減少していた（表 9）。

Total Treatment Days はワクチン接種開始前の 2016 年に比べ、2017 年、2018 年は減少し（それぞれ 28.2、19.7、13.0）、投与経路別では特に注射投与と乳房内投与の減少が顕著であった（表 10）。

考 察

Streptococcus spp. や大腸菌群などによる環境性乳房炎の新規感染は泌乳期よりも乾乳期に起こりやすいと考えられており（Todhunter *et al.* 1995; Smith *et al.* 1985）、大腸菌群においては特に乾乳後 2 週間および分娩前 2 週間の感染リスクが高いとされている

（Hogan & Larry Smith 2003）。また、大腸菌群による乳房炎の 65% は泌乳初期の 2 ヶ月に発生するとされ、この乳房内感染は乾乳期に始まっていると考えられる（Smith *et al.* 1985）。一方、*S. aureus* による乳房炎は伝染性乳房炎に分類され主に搾乳によって牛群内で伝播するが、泌乳期よりも乾乳期での治療の方が治癒率は高いとされている（Barkema *et al.* 2006）。ただ、その治癒率は搾乳衛生や牛の状態、菌の病原性などの諸要因により左右され、慢性化してしまうと完治させることが非常に困難であるため、罹患牛の早期摘発

や感染予防が重要である。

今回使用した二価不活化乳房炎ワクチンは感染リスクが高い分娩前 45 日からワクチン投与を開始し分娩前 10 日、分娩後 52 日と計 3 回投与する。*S. aureus* は組織の表面に定着する際に多糖類、タンパク質、菌対外 DNA などの物質を分泌して強固なバイオフィルムを形成する。バイオフィルム中で増殖した菌の一部は遊離し再び他の組織に定着することにより拡散する (Otto 2008)。*S. aureus* に関してはバイオフィルム形成の際に菌体外に分泌される多糖類を主成分とする“スライム”と呼ばれる構造をターゲットとしたワクチンの研究がされており (Perez *et al.* 2009; Prenafeta *et al.* 2010)、これらの報告では *in vivo* でバイオフィルム産生株の *S. aureus* の感染により slime associated antigenic complex (SAAC)、poly-*N*-acetyl- β -1, 6-glucosamine (PNAG) といったスライム成分の多糖類に対する抗体産生が確認されている。スタートバック®は SAAC を特に多く産生する *S. aureus* SP140 株を用いており、スライムに対する抗体を誘導することによりバイオフィルムの形成を阻害し、*S. aureus* の増殖を抑制することを目的としたワクチンである。また *S. aureus* のみではなく *S. epidermidis* に代表される CNS もスライムを形成するため (Costa *et al.* 2009)、CNS の増殖も期待できる。もう 1 つのワクチン主成分の *E. coli* J5 株は LPS を構成する O 抗原、R コア、リポド A の 3 つの要素のうち O 抗原を欠く。そのため大腸菌群の共通の構造である R コアが露出した構造になっており、それに対する抗体を誘導することにより *E. coli* だけではなく *Klebsiella* 属など他の大腸菌群の増殖

も抑制する共通抗原となりうる (Bradley *et al.* 2015)。スタートバック®は 2009 年に最初に欧州で発売されて以来、世界の乳房炎ワクチン売り上げの約 6 割を占めるまでになり、2016 年から日本でも発売が開始された (Hipra 社 2019)。このワクチンは比較的新しいため野外試験により効果を検証した報告はまだ少なく (Schukken *et al.* 2014; Bradley *et al.* 2015; Landin *et al.* 2015; Freick *et al.* 2016; Guccione *et al.* 2017)、日本での報告もわずかである (萩原 2020) ことに加え、抗菌性物質使用量低減における明確な有効性を示した報告はない。1 農場での試験であり対照としてワクチン非接種群を設定できなかったものの、本研究の結果は日本における本ワクチンの野外試験の貴重なデータである。今回の対象農場では 2017 年よりこのワクチンを使用することにより産前産後の乳房炎の発生を減少させることが示唆された。当農場ではもともと乳房炎による乳廃棄や牛の淘汰が多く、2014 年度に搾乳立会、代謝プロファイルテスト、乾乳パドックの敷料細菌検査を実施し、搾乳手順の変更、飼料給与の増給と給与順序の変更、敷料の種類を変更し、新規乳房炎発生頭数や廃棄乳が減少したという経緯がある (中村ら 2014)。また、ACM を原因とする死亡や淘汰が多かったため、2015 年からは分娩前に毒素原性 *E. coli* ワクチン (Imocolibov®、科学飼料研究所) の接種も行っていた。Imocolibov®は *E. coli* の付着因子 K99、FY、31A 保有株および O78 の不活化菌体を含み、本来は分娩前の母牛に接種されて移行抗体により子牛の大腸菌性下痢症を予防する目的のワクチンであるが、分娩後の ACM の症状を軽減する効果も認められているため、認可された乳房炎ワクチンが無

かった日本では広く使用されてきた (Morimoto *et al.* 2011)。本農場も Imocolibov®の使用開始以降、ACM での死亡や淘汰は殆どみられなかったが、2016 年度でも大腸菌群による乳房炎の発生自体は比較的多く、また *S. aureus* による乳房炎も散見されたため、ワクチンの変更に至った。現在も上記の対策を実施しているため、今回はワクチン接種以外には変更点はなく体細胞の減少や乳房炎発生頭数の減少はこのワクチンの投与による効果だと考察する。抗体価 (特に *E. coli*) を上げるためにこのワクチンは分娩前後の 3 回投与を推奨しているが、ワクチン接種の間隔もあいているため、完璧に全頭の牛に接種するためには詳細な牛群情報の把握とワクチンプログラムの管理が必要となる。今回は分娩予定表にワクチンの接種日を記載し月に 2 回程度ワクチンを接種する日を設けることで、全頭の牛に打ち損じがないようにした。3 回のワクチン接種費用は約 6,000 円程度かかるが、体細胞数と損失乳量は正の相関があり、乳房炎の発生は治療費の増加や抗菌性物質の使用による出荷制限、労働時間の延長、罹患牛の淘汰など様々な経済的損失を伴うことから (Halasa *et al.* 2011; Hand *et al.* 2012)、体細胞数および乳房炎、とくに慢性化しやすい *S. aureus* による乳房炎の発生数が減少したことでコスト以上の経済効果があったと考えられる。また、診療点数、診療回数および Treatment Days が減少していたことから、乳房炎を発症したとしても重篤度は低かったと考えられた。このワクチンは牛群の 50%以上の牛に 3 回目の接種を完了するまで少なくとも 6 から 8 ヶ月以上かかり、集団免疫の効果を判定するまで時間を要するため (Schukken *et al.* 2014)、今後も継続して投与を続ける

必要がある。ただ、最近では接種方法を改変し、同時期に牛群全体に一斉にワクチン接種を開始し、28日後に2回目の接種、90日後に3回目の接種を行う方法で効果があったとする報告もあり（萩原 2020）、管理の簡素化のメリットを考えると、今後は一斉接種を検討してもよいと考える。

結論として、乳房炎の発生には様々な要因が考えられワクチンの使用だけで予防できるわけではないが、本研究の対象農場のように乳房炎起因菌が特定できていて *S. aureus* や大腸菌群による乳房炎による損失が大きい場合、予防の1つの方策としてワクチン接種が有用であると考えられた。他の農家でもワクチン接種を開始しており今後も効果の検証を継続していきたい。

小 括

本章では、二価不活化乳房炎ワクチンの接種により体細胞数、乳房炎の発生数の減少や治療コスト、Treatment Days の減少などの効果を示すことができた。本ワクチンによる抗菌性物質使用量低減の効果を示した研究としては国内では初の報告である。

表7. 臨床型乳房炎発生率（8月から2月）

	2015年度	2016年度	2017年度
分娩頭数	36	47	36
乳房炎発生頭数	20	29	15
発生率（%）	55.6	61.7	41.7

表8. 原因菌種別乳房炎発生頭数

菌種	2015年度	2016年度	2017年度
<i>S. aureus</i>	5	4	1
CNS	3	4	8
<i>T. pyogenes</i>	3	1	2
<i>Bacillus</i> spp.	1	ND	ND
Other streptococci	22	24	14
<i>S. uberis</i>	3	3	5
<i>E. coli</i>	ND	5	5
<i>Klebsiella</i> spp.	4	5	1
<i>P. aeruginosa</i>	ND	ND	2
その他	ND	2	ND
有意菌なし	17	25	4

ND: no data

CNS: Coagulas negative staphylococci

OS: Other streptococci (*S. uberis*以外の*Streptococcus* spp.)

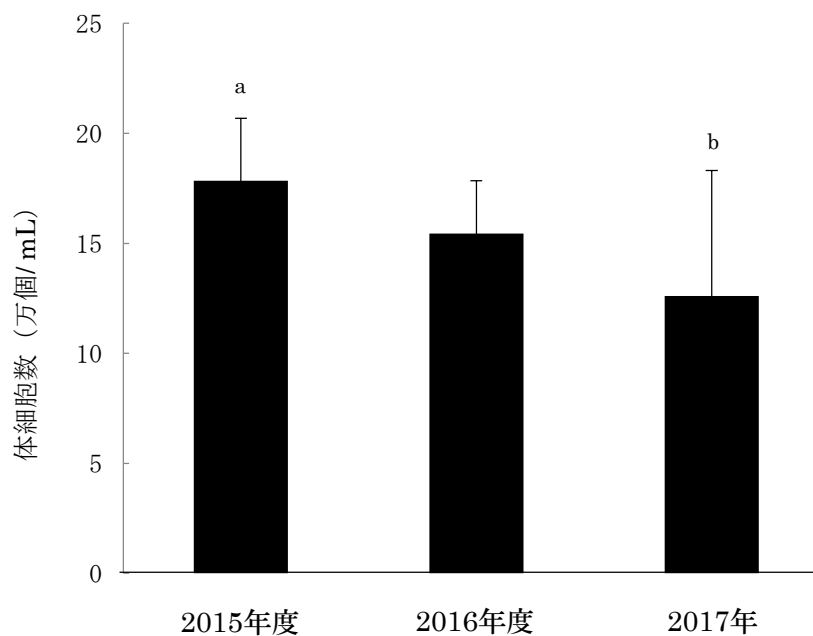


図16. 平均バルク体細胞数（8月から翌年2月）

バルク乳の体細胞数（3回/月測定）の8月から翌年2月までの平均値を示した。6月からスタートバック®の接種を開始した2017年年度は他の年度に比べて体細胞数が減少した。

a – b間： $p < 0.05$ （多重比較検定：Scheffe法）

表9. 乳房炎診療1件あたりの診療点数とのべ診療回数

	2015年度	2016年度	2017年度
診療点数	1007	1313	770
診療回数	121	166	84

診療点数1点：10円に相当

表10. 本農場におけるTotal Treatment Days および投与経路別Treatment Daysの推移

	2014	2015	2016	2017	2018
Total Treatment Days	29.6	32.0	28.2	19.7	13.0
投与経路別 Treatment Days					
注射	3.5	3.7	4.0	2.3	0.9
乳房内	25.4	28.2	23.5	17.2	12.0
経口	0	0.02	0.6	0.2	0
子宮内	0.7	0.1	0.1	0.01	0

第5章

総合考察

酪農における抗菌性物質使用量の現状と課題

本研究では、第2章において有効成分重量ではなく日本版動物用DDD値を用いて集計したTreatment Daysを指標として抗菌性物質使用量を評価することにより、酪農における抗菌性物質の使用実態を反映したデータを得ることができた。また、第3章ではバイオフィルムの関与が疑われる難治性乳房炎に対して抗菌性物質使用の削減につながる新たな治療法を提示し、第4章では乳房炎ワクチンによる抗菌性物質使用量の低減効果を示すことができた。Treatment Daysによる評価の結果、酪農においてはペニシリン系、セファロスポリン系を含むβラクタム系の抗菌性物質の乳房炎に対する使用が抗菌性物質使用量を大きく増加させている要因であることが示された。医学上重要な第3世代セファロスポリン系やフルオロキノロン系、マクロライド系の使用量は今回の調査では比較的少ない水準であり、これは日本では乳房炎にたいして承認されている第3世代セファロスポリン系の製剤がないこと、農業共済の病傷給付（保険適用）基準としてフルオロキノロン系製剤の第1選択薬としての使用が認められていないことや、乳房炎の治療に出荷制限期間が長いマクロライド系製剤を用いることが少ないことなどによるものと考えられる。千葉県農業共済組合では2020年4月より全国的に使用が普及しているLACシステムにより診療データが電子化されており、使用した薬剤や診療点数が集計しやすい形式となったため、より多くの農家での抗菌性物質使用量モニタリングを実施、継続していく予定である。

2016年のAMRアクションプラン公表以降、医療および獣医療の現場では抗菌性物質の

慎重使用が求められるようになり、翌年の 2017 年以降、人用、動物用含めた抗菌性物質の販売量自体は減少しているものの、畜産においては抗菌性物質の販売量自体顕著な減少がみられず、これは獣医師および畜産農家における AMR アクションプランの認知度や抗菌性物質の慎重使用の意識がヒト医療に比べて低いためと考えられる（厚生労働省 2019）。オランダのように政策として抗菌性物質使用量調査および介入を継続し、使用量削減に成功している例もあるため（SDA 2019）、データを公表して自主規制を求めるだけでなく、公的機関の指導や、使用量を削減した農家に対する優遇措置など、何らかの政治的介入も必要であると考えられる。また、たとえ抗菌性物質の慎重使用を励行したとしても感染症による死亡や淘汰を増加させる事態を招く可能性も考えられる。そのような事態に陥らないために、的確な診断に基づいて最低限必要な抗菌性物質を使用するとともに、バイオフィーム関連感染症などの慢性感染症に対する治療法の研究やワクチン使用などによる感染症防除に努めることが重要である。

乳房炎防除による抗菌性物質使用量低減

これまでの報告と同様、本研究では乳房炎の治療、特に乾乳期治療は抗菌性物質使用量の大部分を占めることが明らかになった。乾乳期治療は現在主流の BDCT から SDCT に移行することで大きく抗菌性物質使用量を削減できると考えられるが、乾乳期から分娩移行期の衛生状態や牛の健康状態によっては、SDCT により逆に周産期から泌乳期の臨床型

乳房炎が増加してしまう可能性もある。SDCT に関しては一定の基準を設けて農家を慎重に選択し、損失が増加しないよう実施する必要がある。

ワクチンによる乳房炎防除も、本研究では抗菌性物質使用量低減における有効性が示されたが、あまり効果がないとする報告もある (Landin *et al.* 2015; Freick *et al.* 2016)。有効性の指標として体細胞数、臨床型乳房炎発生数、基本再生産率、産次別の集計など、文献によって一定ではないこともワクチン効果の評価が異なる要因ではあるが、ワクチンの有効性はやはり農場の環境、牛の健康状態および乳房炎起因菌の構成などに左右されるところが大きいと考えられる。本研究ではこれらの要因のうちデータが得られなかったものも多く、対象農家が1戸のみと少なかったため、今後は更に多くの農家でデータを収集し、より多くの要因を考慮した解析を行う必要がある。臨床現場に求められる対応としては、現在乳房炎ワクチンとして最も広く用いられているワクチンであるスタートバック®は *S. aureus*、CNS、大腸菌群に有効なワクチンであるため、使用を開始する前に農場の乳房炎起因菌を特定し、コストに見合った効果が期待できるかどうかを予測する必要があると考える。また国外では、*S. uberis* に対するワクチンも販売開始されており (Collado *et al.* 2018)、今後その効果の検証が期待される。

その他の取り組み

乳房炎以外にも、周産期疾病や肺炎、腸炎、蹄病なども抗菌性物質を多く使用する疾病で

ある。腸炎に関しては、様々な抗菌性物質を用いても治癒しない症例に対して、健康牛の糞便を直腸に移植する糞便微生物移植（FMT）の取り組みを行っており、有効性を確認している（松浦ら 2019）。また、蹄病において最も問題となる感染症はトレポネーマ属菌を主病原菌とする polymicrobial 感染症である趾皮膚炎（DD）である（Wilson-Welder *et al.* 2015）。DD はテトラサイクリン系やリンコマイシン系抗菌性物質などの局所塗布による治療が主流であるが、慢性化しやすく感染力も高いためフリーストール牛群を中心に全世界的に蔓延しており、抗菌性物質の過剰使用の 1 要因となっている。日本では蹄病に対して局所使用が承認されている抗菌性物質がないため乳房内注入薬や注射薬を獣医師の裁量で転用しているというのが実情であり、今回用いた手法では蹄病に対する抗菌性物質使用量を把握することはできなかったが、DD が蔓延している農場では相当数の抗菌性物質が使用されていると推察される。近年、多くは無いが抗菌性物質を用いない DD の治療の研究も報告されている（Laven *et al.* 2002; Holzhauser *et al.* 2011; Chiba *et al.* 2017）。これらのように、乳房炎に限らず様々な感染症に対して抗菌性物質の使用に代替する治療の研究が試みられており、今後も継続が期待される。

臨床獣医師としての提言

本研究では畜産分野の臨床獣医師として働く中で得られたデータをまとめ、酪農における抗菌性物質使用とそれに関連した乳房炎の治療および予防に関する新たな知見を得るこ

とができた。日本の畜産農家、特に酪農家においてはその多くが家畜共済制度に加入し、家畜の保険と診療サービスを提供されている。現行制度では、掛金などに応じて上限はあるものの診療費（診療点数）の9割が病傷事故に対する共済金として支払われる（農林水産省 2019c）。この制度により加入農家の診療費負担額は少なく済むというメリットがある反面、起きてしまった疾病に対して診療や抗菌性物質などの医薬品で対処する習慣を助長し、獣医師、農家双方の疾病予防に対する意識が低下しやすいというデメリットがあると考えられる。第2章で示した結果は、乳牛の最も重要な感染症である乳房炎の対策が抗菌性物質による治療に依存していることを示唆しており、これは家畜共済に携わる臨床獣医師として日々実感している感覚と一致するものである。しかしながら、原則として病傷事故給付基準に準拠して抗菌性物質の使用を行っており、実際の使用量以上に抗菌性物質を処方しているわけではないため、乳房炎の多発する現状のまま抗菌性物質使用量を削減することは困難である。今後は第3、4章で示したような治療および予防に関するエビデンスを重ね、臨床現場で抗菌性物質使用量低減のための啓蒙活動を続けるとともに、ワクチンなどの予防医療に対しても実施した農家の負担が軽減されるような制度の構築を共済団体や自治体などに働きかけていきたいと考える。

結 論

酪農において抗菌性物質の使用量を低減するためには、乳房炎の防除の取り組みが最も有効な手段である。モニタリングによる抗生物質使用の情報収集を継続するとともに、治療法の改善、およびワクチンなどによる疾病予防の取り組みなどに関して更なる研究を重ね、有効な方法を模索していく必要がある。

謝 辞

本論文は筆者が千葉県農業共済組合で獣医師として勤務しながら東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻獣医学博士課程に在籍した期間に行った研究成果をまとめたものであり、論文提出にあたり多くの方々のご指導、ご協力を賜りました。

指導教員ならびに主査を引き受けてくださった同大学大学院農学生命科学研究科准教授の松田二子先生に厚く御礼申し上げます。松田先生がご専門とされている繁殖学とは関連の薄いテーマであるにも関わらず、親身になって昼夜を問わず研究の遂行および論文作成の指導をしていただき、誠にありがとうございました。本博士論文に関わる投稿論文の責任著者ならびに審査委員会委員を引き受けてくださった同大学大学院農学生命科学研究科教授の杉浦勝明先生に厚く御礼申し上げます。杉浦先生の研究室所属の学生ではないにも関わらず懇切丁寧に論文執筆の指導をしていただき、誠にありがとうございました。審査委員会委員を引き受けてくださり、投稿論文執筆および学位申請にあたり有益なご指導、ご助言をいただきました同大学大学院農学生命科学研究科教授の芳賀猛先生に厚く御礼申し上げます。審査委員会委員を引き受けてくださり、論文内容に関して多くの的確なご助言をいただきました同大学大学院農学生命科学研究科教授の猪熊壽先生、特任教授の横山隆先生に厚く御礼申し上げます。本博士論文に関わる学術論文作成にあたり共同研究者として多大なるご協力とご助言を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所の菊佳男先生、甲斐千暁先生、千葉県農業共済組合の清水秀茂氏、田中秀和氏、額田聡子氏、松井崇氏、菅原久枝氏、岡部卓馬氏、中村友彦氏、大谷夏輝氏に深謝致します。千葉県農業共済組合本部の天谷裕次氏、栗原永治氏、武井洋一郎氏、井上宣子氏、同北部家畜診療所の森清之氏、同東部家畜診療所の大慈祐介氏、清水優氏、平田昇氏、同西部家畜診療所の水谷英一郎氏、天野はな氏、山村文之介氏、佐々田純氏、伊東和子氏、同西部家畜診療所八千代出張所の富山洋氏、近藤敦子氏、石山大氏、中村芳弘氏、永井智子氏、同OBの吉浦信幸氏、大和田清司氏には、大学院での研究にご理解をいただき、仕事の面でも多くのご支援をいただいたことを深謝致します。また、本研究の遂行にあたりデータ提供や臨床試験などにご理解、ご協力いただいた千葉県内の酪農家の皆様に深謝致します。東京大学大学院農学生命科学研究科獣医繁殖育種学研究室メンバーの真方文絵先生、佐藤真梨萌氏、迫野貴大氏、大下雪奈氏、王茜氏、戸田理沙氏、陳昉氏、黒木智絵氏、野村菜奈氏、元メンバーの立川君子氏、田中哲弥氏、棟朝亜理紗氏、美辺詩織氏、青木悦成氏、和泉すみれ氏、伊藤祥子氏、高橋宙大氏、戴明道氏、福本善之

助氏、Josh Octura 氏、陳晶氏、棚橋美優氏、林薫氏、福嶋恵梨氏、木越敦子氏、藤井陽介氏、磯部有紀氏、高橋ひとみ氏には、本研究の遂行および大学院生活において多大なるご協力をいただき、あまり研究室の仕事や行事に参加できなかった私に対しても温かく接して下さったことを感謝致します。同大学大学院農学生命科学研究科准教授の松脇貴志先生には、隣の研究室ではありますが学部生時代から気にかけてくださり、博士論文作成の際もご支援いただいたことを感謝致します。学部生時代に指導していただいた東海大学総合農学研究所教授の今川和彦先生、東京農工大学グローバルイノベーション研究院教授の永岡謙太郎先生には、卒業後も折に触れて激励のお言葉をかけていただいたことを感謝致します。岡山大学大学院環境生命科学研究科教授の木村康二先生、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門の若林嘉浩先生、山村崇先生、岡村裕昭先生、名古屋大学大学院生命農学研究科教授の東村博子先生、大蔵聡先生、同大学大学院生命農学研究科准教授の松山秀一先生、東京大学大学院農学生命科学研究科教授の武内ゆかり先生、同大学大学院農学生命科学研究科准教授の李俊佑先生、同大学大学院農学生命科学研究科附属牧場スタッフの皆様には、論文化には至りませんでしたでしたが大学院入学当初の研究テーマであった「雄牛フェロモンの同定と実用化に関する研究」に関して多大なるご指導、ご協力をいただいたことを感謝致します。そして、大学院入学時の指導教員でありました東京大学大学院農学生命科学研究科前教授の故・前多敬一郎先生には、研究室に受け入れてくださり研究の心構えなどを含めご指導いただいたこと、研究が思うように進まない私の身を案じて親身に相談に乗っていただいたことを深く感謝致します。

最後に、仕事をしながらの大学院生活を支えてくれた両親、義父母、妻の麻美、息子の研太、娘の桃佳に心から感謝します。

参考文献

- Atkinson O. Management of transition cows in dairy practice, In Practice 2016; 38: 229-240.
- Barkema HW, Schukken YH, Zadoks RN. Invited Review: The role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. J Dairy Sci. 2006; 89(6): 1877-1895.
- Berry EA, Hillerton JE. The effect of selective dry cow treatment on new intramammary infections. J Dairy Sci. 2002; 85(1): 112-121.
- Bohl LP, Isaac P, Bresler ML, Orellano MS, Correa SG, de Talamoni NGT, Porporatto C. Interaction between bovine mammary epithelial cells and planktonic or biofilm *Staphylococcus aureus*: The bacterial lifestyle determines its internalization ability and the pathogen recognition. Microbial Pathogenesis. 2020: 104604.
- Boireau C, Cazeau G, Jarrige N, Calavas D, Madec JY, Leblond A, Haenni M, Gay É. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from mastitis in dairy cattle in France, 2006-2016. J Dairy Sci. 2018; 101(10): 9451-9462.
- Bradley AJ, Green MJ. The importance of the nonlactating period in the epidemiology of intramammary infection and strategies for prevention. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2004; 20(3): 547-568.

Bradley AJ, Breen JE, Payne B, White V, Green MJ. An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. *J Dairy Sci.* 2015; 98(3): 1706-1720.

Brunton LA, Duncan D, Coldham NG, Snow LC, Jones JR. A survey of antimicrobial usage on dairy farms and waste milk feeding practices in England and Wales. *Vet Rec.* 2012; 171(12): 296.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention): Antibiotic Resistance Threats in the United States, 2013, <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>

Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(6): 1771-1776.

Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J. Antimicrob. Chemother.* 2014; 69(3): 827-834.

Chiba A, Sugimoto S, Sato F, Hori S, Mizunoe Y. A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability. *Microb Biotechnol.* 2015; 8(3): 392-403.

Chiba K, Miyazaki T, Sekiyama Y, Miyazaki M, Okada K. The therapeutic efficacy of allyl isothiocyanate in cows with bovine digital dermatitis. *J Vet Med Sci.* 2017; 79(7): 1191-1195.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science.* 1999; 284(5418): 1318-1322.

Collado R, Montbrau C, Sitjà M, Prenafeta A. Study of the efficacy of a *Streptococcus uberis* mastitis vaccine against an experimental intramammary infection with a heterologous strain in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2018; 101(11): 10290-10302.

Cooper MA, Shlaes D. Fix the antibiotics pipeline. *Nature.* 2011 ; 472 (7341): 32.

Costa AR, Henriques M, Oliveira R, Azeredo J. The role of polysaccharide intercellular adhesin (PIA) in *Staphylococcus epidermidis* adhesion to host tissues and subsequent antibiotic tolerance. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009; 28(6): 623-629.

Dalecki AG, Crawford CL, Wolschendorf F. Targeting biofilm associated *Staphylococcus aureus* using resazurin based drug-susceptibility assay. *J Vis Exp.* 2016; 111: 53925.

Dellit TH, Owens RC, McGowan JE Jr, Gerding DN, Weinstein RA, Burke JP, Huskins WC, Paterson DL, Fishman NO, Carpenter CF, Brennan PJ, Billeter M, Hooton TM; Infectious Diseases Society of America; Society for Healthcare Epidemiology of America. Infectious Diseases Society of America and the Society for Healthcare Epidemiology of America guidelines for developing an institutional program to enhance antimicrobial stewardship. *Clin Infect Dis.* 2007; 44(2): 159-177.

Dieser SA, Fessia AS, Ferrari MP, Raspanti CG, Odierno LM. *Streptococcus uberis*: In vitro biofilm production in response to carbohydrates and skim milk. *Rev Argent Microbiol.* 2017; 49(4): 305-310.

Dufour S, Dohoo IR, Barkema HW, Descôteaux L, Devries TJ, Reyher KK, Roy JP, Scholl DT. Manageable risk factors associated with the lactational incidence, elimination, and prevalence of *Staphylococcus aureus* intramammary infections in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2012; 95(3): 1283-1300.

Dunne WM Jr. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev.* 2002; 15(2): 155-166.

Duse A, Persson Waller K, Emanuelson U, Ericsson Unnerstad H, Persson Y, Bengtsson B. Occurrence and spread of quinolone-resistant *Escherichia coli* on dairy farms. *Appl Environ Microbiol.* 2016; 82(13): 3765-3773.

EMA (European Medicine Agency), 2015, Principles on assignment of defined daily dose for animals (DDDvet) and defined course dose for animals (DCDvet)., http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/06/WC500188890.pdf

FDA (Food and Drug Administration), Summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food producing animals., 2015, <https://www.fda.gov/files/about%20fda/published/2015-Summary-Report-on-Antimicrobials-Sold-or-Distributed-for-Use-in-Food-Producing-Animals.pdf>

Fischbach MA, Walsh CT. Antibiotics for emerging pathogens. *Science*. 2009; 325(5944): 1089-1093.

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Br J Exp Pathol*. 1929; 10(3): 226-236.

Franz S, Floek M, Hofmann-Parisot M. Ultrasonography of the bovine udder and teat. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*. 2009; 25(3): 669-685.

Freick M, Frank Y, Steinert K, Hamedy A, Passarge O, Sobiraj A. Mastitis vaccination using a commercial polyvalent vaccine or a herd-specific *Staphylococcus aureus* vaccine. Results of a controlled field trial on a dairy farm. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere*. 2016; 44(4): 219-229.

Gauvain H. Sea bathing in the treatment of surgical tuberculosis. *Br Med J.* 1935; 2(3909): 1087-1090.

Geoghegan JA, Corrigan RM, Gruszka DT, Speziale P, O'Gara JP, Potts JR, Foster TJ. Role of surface protein SasG in biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol.* 2010; 192(21): 5663-5673.

Gomes F, Saavedra MJ, Henriques M. Bovine mastitis disease/pathogenicity: evidence of the potential role of microbial biofilms. *Pathog Dis.* 2016; 74(3): ftw006.

González Pereyra V, Pol M, Pastorino F, Herrero A. Quantification of antimicrobial usage in dairy cows and preweaned calves in Argentina. *Prev Vet Med.* 2015; 122(3): 273-279.

Government of Japan, 2016. National Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020. <https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-10900000-Kenkoukyoku/0000138942.pdf>

Graham JP, Evans SL, Price LB, Silbergeld EK. Fate of antimicrobial-resistant enterococci and staphylococci and resistance determinants in stored poultry litter. *Environ Res.* 2009; 109(6): 682-689.

Gruet P, Maincent P, Berthelot X, Kaltsatos V. Bovine mastitis and intramammary drug delivery: review and perspectives. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001; 50(3): 245-259.

Guccione J, Pesce A, Pascale M, Salzano C, Tedeschi G, D'Andrea L, De Rosa A, Ciaramella P. Efficacy of a polyvalent mastitis vaccine against *Staphylococcus aureus* on a dairy Mediterranean buffalo farm: results of two clinical field trials. *BMC Vet Res.* 2017; 13(1): 29.

Haimerl P, Arlt S, Borchardt S, Heuwieser W. Antibiotic treatment of metritis in dairy cows-A meta-analysis. *J Dairy Sci.* 2017; 100(5): 3783-3795.

Halasa T, Huijps K, Østerås O, Hogeveen H. Economic effects of bovine mastitis and mastitis management: a review. *Vet Q.* 2007; 29(1): 18-31.

Hand KJ, Godkin A, Kelton DF. Milk production and somatic cell counts: a cow-level analysis. *J Dairy Sci.* 2012; 95(3): 1358-1362.

Hao H, Cheng G, Iqbal Z, Ai X, Hussain HI, Huang L, Dai M, Wang Y, Liu Z, Yuan Z. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Front Microbiol.* 2014; 5: 288.

Heider LC, Funk JA, Hoet AE, Meiring RW, Gebreyes WA, Wittum TE. Identification of Escherichia coli and Salmonella enterica organisms with reduced susceptibility to ceftriaxone from fecal samples of cows in dairy herds. *Am J Vet Res.* 2009; 70(3): 389-393.

Heinlin J, Schiffner-Rohe J, Schiffner R, Einsele-Krämer B, Landthaler M, Klein A, Zeman F, Stolz W, Karrer S. A first prospective randomized controlled trial on the efficacy and safety of synchronous balneophototherapy vs. narrow-band UVB monotherapy for atopic dermatitis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2011; 25(7): 765-773.

Herago T, Agonafir A. Growth promoters in cattle. *Advances in Biological Research.* 2017, 11(1): 24-34.

Higgins HM, Dryden IL, Green MJ. A Bayesian elicitation of veterinary beliefs regarding systemic dry cow therapy: variation and importance for clinical trial design. *Prev Vet Med.* 2012; 106(2): 87-96.

Hillerton JE, Kliem KE. Effective treatment of Streptococcus uberis clinical mastitis to minimize the use of antibiotics. *J Dairy Sci.* 2002; 85(4): 1009-1014.

HIPRA 社, "HIPRAnews", 2019-1-30,

<https://www.hipra.com/portal/en/hipra/about/news/detail/mastitis-prevention-10-years>

(参照 2020-12-10)

Hockenhull J, Turner AE, Reyher KK, Barrett DC, Jones L, Hinchliffe S, Buller HJ.

Antimicrobial use in food-producing animals: a rapid evidence assessment of stakeholder practices and beliefs. *Vet Rec.* 2017; 181(19): 510.

Hogan J, Larry Smith K. Coliform mastitis. *Vet Res.* 2003; 34(5): 507-519.

Holzhauser M, Bartels CJ, van Barneveld M, Vulders C, Lam T. Curative effect of topical treatment of digital dermatitis with a gel containing activated copper and zinc chelate. *Vet Rec.* 2011; 169(21): 555.

Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence.* 2011; 2(5): 435-444.

Hughes P, Heritage J. Antibiotic growth-promoters in food animals. In: *FAO Animal Production and Health Paper.* 2004; 129-152.

Huijps K, Lam TJ, Hogeveen H. Costs of mastitis: facts and perception. *J Dairy Res.* 2008; 75(1): 113-120.

Jaśkiewicz M, Janczura A, Nowicka J, Kamysz W. Methods Used for the Eradication of Staphylococcal Biofilms. *Antibiotics (Basel).* 2019; 8(4): 174.

Kajiyama S, Tsurumoto T, Osaki M, Yanagihara K, Shindo H. Quantitative analysis of *Staphylococcus epidermidis* biofilm on the surface of biomaterial. *J Orthop Sci.* 2009; 14(6): 769-775.

Kanjanawasee D, Seresirikachorn K, Chitsuthipakorn W, Snidvongs K. Hypertonic Saline Versus Isotonic Saline Nasal Irrigation: Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Rhinol Allergy.* 2018; 32(4): 269-279.

Kaplan HB, Greenberg EP. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol.* 1985; 163(3): 1210-1214.

Kayitsinga J, Schewe RL, Contreras GA, Erskine RJ. Antimicrobial treatment of clinical mastitis in the eastern United States: The influence of dairy farmers' mastitis management and treatment behavior and attitudes. *J Dairy Sci.* 2017; 100(2):1388-1407.

Keane OM. Symposium review: Intramammary infections-Major pathogens and strain-associated complexity. *J Dairy Sci.* 2019; 102(5): 4713-4726.

Knapp CW, Dolfing J, Ehlert PA, Graham DW. Evidence of increasing antibiotic resistance gene abundances in archived soils since 1940. *Environ Sci Technol.* 2010; 44(2): 580-587.

Lam TJ, van den Borne BH, Jansen J, Huijps K, van Veersen JC, van Schaik G, Hogeveen H. Improving bovine udder health: a national mastitis control program in the Netherlands. *J Dairy Sci.* 2013; 96(2): 1301-1311.

Landin H, Mörk MJ, Larsson M, Waller KP. Vaccination against *Staphylococcus aureus* mastitis in two Swedish dairy herds. *Acta Vet Scand.* 2015; 57: 81.

Larsen J, Clasen J, Hansen JE, Paulander W, Petersen A, Larsen AR, Frees D. Copresence of tet(K) and tet(M) in livestock-associated Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clonal complex 398 is associated with increased fitness during exposure to sublethal concentrations of Tetracycline. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(7): 4401-4403.

Laven RA, Hunt H. Evaluation of copper sulphate, formalin and peracetic acid in footbaths for the treatment of digital dermatitis in cattle. *Vet Rec.* 2002; 151(5): 144-146.

Lawn JE, Cousens S, Zupan J; Lancet Neonatal Survival Steering Team. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet.* 2005; 365(9462): 891-900.

Laxminarayan R, Duse A, Wattal C, Zaidi AK, Wertheim HF, Sumpradit N, Vlieghe E, Hara GL, Gould IM, Goossens H, Greko C, So AD, Bigdeli M, Tomson G, Woodhouse W, Ombaka E, Peralta AQ, Qamar FN, Mir F, Kariuki S, Bhutta ZA, Coates A, Bergstrom R, Wright GD, Brown ED, Cars O. Antibiotic resistance-the need for global solutions. *Lancet Infect Dis.* 2013; 13(12): 1057-1098.

Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2008; 322: 107-131.

Lhermie G, Tauer LW, Gröhn YT. The farm cost of decreasing antimicrobial use in dairy production. *PLoS One.* 2018; 13(3): e0194832.

Loo E, Lai KS, Mansor R, Antimicrobial usage and resistance in dairy cattle production, 2020, DOI: 10.5772/intechopen.81365

Mahmmod YS, Klaas IC, Svennesen L, Pedersen K, Ingmer H. Communications of *Staphylococcus aureus* and non-*aureus* *Staphylococcus* species from bovine intramammary infections and teat apex colonization. *J Dairy Sci.* 2018; 101(8): 7322-7333.

Mann S, McArt J, Abuelo A, Production-related metabolic disorders of cattle: ketosis, milk fever and grass staggers, *In Practice* 2019; 41: 205-219.

Merritt JH, Kadouri DE, O'Toole GA. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protoc Microbiol.* 2005; Chapter 1: Unit 1B.1.

Molina-Manso D, del Prado G, Ortiz-Pérez A, Manrubia-Cobo M, Gómez-Barrena E, Cordero-Ampuero J, Esteban J. In vitro susceptibility to antibiotics of staphylococci in biofilms isolated from orthopaedic infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 41(6): 521-523.

Morimoto K, Shimizu M, Kurose T, Nakatani K, Akita S, Shinozuka Y, Isobe N. Efficacy of enterotoxigenic *Escherichia coli* vaccine for bovine clinical mastitis. *J Dairy Res.* 2011; 78(2): 149-153.

Mullard A. Pharmaceutical firms commit US\$1 billion to antibiotic development. *Nat Rev Drug Discov.* 2020; 19(9): 575-576.

Niemi RE, Vilar MJ, Dohoo IR, Hovinen M, Simojoki H, Rajala-Schultz PJ. Antibiotic dry cow therapy, somatic cell count, and milk production: Retrospective analysis of the associations in dairy herd recording data using multilevel growth models. *Prev Vet Med.* 2020; 180: 105028.

Nobrega DB, De Buck J, Barkema HW. Antimicrobial resistance in non-aureus staphylococci isolated from milk is associated with systemic but not intramammary administration of antimicrobials in dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2018; 101(8): 7425-7436.

Okabe T, Shimizu H, Kurihara E, Matsui T, Watanabe T, Haneishi T, Takagi N, Kikuchi M, Fujimoto Y, Yamazaki S. Investigation of antibiotics uses in dairy farms in Chiba Prefecture for a national action plan on antimicrobial resistance. World Buiatrics Congress 2018

Oliver SP, Murinda SE, Jayarao BM. Impact of antibiotic use in adult dairy cows on antimicrobial resistance of veterinary and human pathogens: a comprehensive review. Foodborne Pathog Dis. 2011; 8(3): 337-355.

Oliver SP, Murinda SE. Antimicrobial resistance of mastitis pathogens. Vet Clin North Am Food Anim Pract. 2012; 28(2): 165-185.

O'Neill J: Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, 2016, https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final%20paper_with%20cover.pdf

O'Toole GA. Microtiter dish biofilm formation assay. J Vis Exp. 2011; 47: 2437.

Otto M. Staphylococcal biofilms. Curr Top Microbiol Immunol. 2008; 322: 207-228.

Pedersen K. Method for studying microbial biofilms in flowing-water systems. Applied and environmental microbiology. 1982; 43(1): 6–13.

Pérez MM, Prenafeta A, Valle J, Penadés J, Rota C, Solano C, Marco J, Grilló MJ, Lasa I, Irache JM, Maira-Litran T, Jiménez-Barbero J, Costa L, Pier GB, de Andrés D, Amorena B. Protection from *Staphylococcus aureus* mastitis associated with poly-N-acetyl beta-1, 6 glucosamine specific antibody production using biofilm-embedded bacteria. *Vaccine*. 2009; 27(17): 2379-2386.

Petersson-Wolfe CS., Mullarky IK, Jones GM. "Staphylococcus aureus mastitis: cause, detection, and control.", vtechworks.lib.vt.edu, 2010.

Pol M, Ruegg PL. Treatment practices and quantification of antimicrobial drug usage in conventional and organic dairy farms in Wisconsin. *J Dairy Sci*. 2007; 90(1): 249-261.

Postma M, Sjölund M, Collineau L, Lösken S, Stärk KD, Dewulf J; MINAPIG Consortium. Assigning defined daily doses animal: a European multi-country experience for antimicrobial products authorized for usage in pigs. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70(1): 294-302.

Prenafeta A, March R, Foix A, Casals I, Costa L. Study of the humoral immunological response after vaccination with a *Staphylococcus aureus* biofilm-embedded bacterin in dairy cows: possible role of the exopolysaccharide specific antibody production in the protection from *Staphylococcus aureus* induced mastitis. *Vet Immunol Immunopathol*. 2010; 134(3-4): 208-217.

Price LB, Johnson E, Vailes R, Silbergeld E. Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* isolates from conventional and antibiotic-free chicken products. *Environ Health Perspect.* 2005; 113(5): 557-560.

Saini V, McClure JT, Scholl DT, DeVries TJ, Barkema HW. Herd-level association between antimicrobial use and antimicrobial resistance in bovine mastitis *Staphylococcus aureus* isolates on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 2012; 95(4): 1921-1929.

Saini V, McClure JT, Scholl DT, DeVries TJ, Barkema HW. Herd-level relationship between antimicrobial use and presence or absence of antimicrobial resistance in gram-negative bovine mastitis pathogens on Canadian dairy farms. *J Dairy Sci.* 2013; 96(8): 4965-4976.

Scherpenzeel CGM, den Uijl IEM, van Schaik G, Riekerink RGMO, Hogeveen H, Lam TJGM. Effect of different scenarios for selective dry-cow therapy on udder health, antimicrobial usage, and economics. *J Dairy Sci.* 2016; 99(5): 3753-3764.

Schönborn S, Krömker V. Detection of the biofilm component polysaccharide intercellular adhesin in *Staphylococcus aureus* infected cow udders. *Vet Microbiol.* 2016; 196: 126-128.

Schukken YH, Bronzo V, Locatelli C, Pollera C, Rota N, Casula A, Testa F, Scaccabarozzi L, March R, Zalduendo D, Guix R, Moroni P. Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. *J Dairy Sci.* 2014; 97(8): 5250-5264.

SDA (The Netherlands Veterinary Medicines Institute), 2019, Usage of Antibiotics in Agricultural Livestock in the Netherlands in 2018., <https://cdn.impactpulse.nl/autoriteitdiergeneesmiddelen/userfiles/Publications/2018-def-rapport1.pdf>

SDA (The Netherlands Veterinary Medicines Institute, 2014, Dutch Veterinary Medicines Authority; Usage of antibiotics in agricultural livestock in the Netherlands in 2013, <http://www.autoriteitdiergeneesmiddelen.nl/en/publications>

Seale AC, Gordon NC, Islam J, Peacock SJ, Scott JAG. AMR Surveillance in low and middle-income settings - A roadmap for participation in the Global Antimicrobial Surveillance System (GLASS). *Wellcome Open Res.* 2017; 2: 92.

Sears PM, McCarthy KK. Management and treatment of staphylococcal mastitis. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice.* 2003; 19(1): 171-185.

Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res.* 2003; 34(5): 475-491.

Shinozuka Y, Hirata H, Ishibashi I, Okawa Y, Kasuga A, Takagi M, Taura Y.

Therapeutic efficacy of mammary irrigation regimen in dairy cattle diagnosed with acute E. coliform mastitis. *J Vet Med Sci.* 2009; 71(3): 269-273.

Singh R, Ray P. Quorum sensing-mediated regulation of staphylococcal virulence and antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2014; 9(5): 669-681.

Smith TC, Gebreyes WA, Abley MJ, Harper AL, Forshey BM, Male MJ, Martin HW, Molla BZ, Sreevatsan S, Thakur S, Thiruvengadam M, Davies PR. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pigs and farm workers on conventional and antibiotic-free swine farms in the USA. *PLoS One.* 2013; 8(5): e63704.

Smith KL, Todhunter DA, Schoenberger PS. Environmental mastitis: cause, prevalence, prevention. *J Dairy Sci.* 1985; 68(6): 1531-1553.

Stevens M, Piepers S, Supré K, Dewulf J, De Vliegher S. Quantification of antimicrobial consumption in adult cattle on dairy herds in Flanders, Belgium, and associations with udder health, milk quality, and production performance. *J Dairy Sci.* 2016; 99(3): 2118-2130.

Swinkels JM, Hilkens A, Zoche-Golob V, Krömker V, Buddiger M, Jansen J, Lam TJ. Social influences on the duration of antibiotic treatment of clinical mastitis in dairy cows. *J Dairy Sci.* 2015; 98(4): 2369-2380.

Tang X, Flint SH, Bennett RJ, Brooks JD, Morton RH. Biofilm growth of individual and dual strains of *Klebsiella oxytoca* from the dairy industry on ultrafiltration membranes. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2009; 36(12): 1491-1497.

Todhunter DA, Smith KL, Hogan JS. Environmental streptococcal intramammary infections of the bovine mammary gland. *J Dairy Sci.* 1995; 78(11): 2366-2374.

Tsukatani T, Kawaguchi T, Suenaga H, Shiga M, Ikegami T, Rapid and simple determination of minimum biofilm eradication concentration by a colorimetric microbial viability assay based on reduction of a water-soluble tetrazolium salt and combined effect of antibiotics against microbial biofilm. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.,* 2016; 6: 677-680.

USDA (United States Department of Agriculture), 2008, Dairy 2007. Part III: Reference of Dairy Cattle Health and Management Practices in the United States, <https://naldc.nal.usda.gov/download/46188/PDF>

Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015; 112(18): 5649-5654.

van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, Jansen MD, Spalburg EC, de Neeling AJ, Allaart JG, van Nes A, Wagenaar JA, Fluit AC. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Vet Microbiol*. 2008; 126(4): 383-389.

Viswanathan R, Singh AK, Ghosh C, Dasgupta S, Mukherjee S, Basu S. Profile of neonatal septicaemia at a district-level sick newborn care unit. *J Health Popul Nutr*. 2012; 30(1): 41-48.

Wagner S, Erskine R, 2013, Antimicrobial drug use in mastitis. In *Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine*, <https://doi.org/10.1002/9781118675014.ch30>.

Waters D, Jawad I, Ahmad A, Lukšić I, Nair H, Zgaga L, Theodoratou E, Rudan I, Zaidi AK, Campbell H. Aetiology of community-acquired neonatal sepsis in low and middle income countries. *J Glob Health*. 2011; 1(2): 154-170.

WHO (World Health Organization): Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, 2017, https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1

Wilson-Welder JH, Alt DP, Nally JE. Digital dermatitis in cattle: Current bacterial and immunological findings. *Animals (Basel)*. 2015; 5(4): 1114-1135.

You Y, Silbergeld EK. Learning from agriculture: understanding low-dose antimicrobials as drivers of resistome expansion. *Front Microbiol.* 2014; 5: 284.

Yu ZN, Wang J, Ho H, Wang YT, Huang SN, Han RW. Prevalence and antimicrobial-resistance phenotypes and genotypes of *Escherichia coli* isolated from raw milk samples from mastitis cases in four regions of China. *J Glob Antimicrob Resist.* 2020; 22: 94-101.

Yu L, Li W, Zhang M, Cui Y, Chen X, Ni J, Yu L, Shang F, Xue T. Imidazole decreases the ampicillin resistance of an *Escherichia coli* strain isolated from a cow with mastitis by inhibiting the function of autoinducer 2. *J Dairy Sci.* 2018; 101(4): 3356-3362.

Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. *Drugs.* 2007; 67(7): 1027-1052.

厚生労働省, "薬剤耐性ワンヘルス動向調査年次報告 2019", 2020-11-5,
<https://www.mhlw.go.jp/content/10906000/000691722.pdf> (参照 2020-12-10)

近藤寧子, 松井崇, 三浦道三郎ら. *Streptococcus* 乳房炎に対する泌乳期ショート乾乳の効果. *家畜衛生学会誌* 2013; 39(3): 130-131.

篠塚康典. 大腸菌性乳房炎にどう対峙するか. *家畜感染症学会誌* 2015; 4(4): 179-186.

杉浦勝明. 2015; 動物用抗菌剤の使用量調査に関する情報整備.

田中秀和, 井上宣子, 菅原久枝. 慢性乳房炎 (*Streptococcus uberis* 感染症)に対するショート乾乳治療の取り組み. 臨床獣医 2017; 35(6): 12-18.

田村 豊. 食用動物に由来する薬剤耐性菌の現状と対策. 環境感染誌 2017; 32 (6): 322-329.

津谷喜一郎, 五十嵐中, 森川馨. ATC/DDD とは何か 医薬品の合理的使用を目指すものさし. 薬剤疫学 2004; 9(2): 53-58.

中村友彦, 菊池允人, 田中秀和. 管内 1 酪農家における乳質改善の取り組み. 千葉県農業共済組合紫葉会誌 2014; 59: 52-56.

農林水産省 "畜産物生産における動物用抗菌性物質製剤の慎重使用に関する基本的な考え方" 2013-12-24, https://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/yakuzi/pdf/prudent_use.pdf

(参照 2020-12-10)

農林水産省 "畜産統計調査" 2016-10-21,

<https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan/> (参照 2020-12-10)

農林水産省 "各種抗生物質・合成抗菌剤・駆虫剤・抗原虫剤の販売高と販売量 (2018) "

https://www.maff.go.jp/nval/iyakutou/hanbaidaka/pdf/h30_hanbaidaka.pdf (参照
2020-12-10)

農林水産省 "本格的議論のための酪農・乳業の課題" 2019-10-10 (2019a)

<https://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/tikusan/attach/pdf/siryoku191010-17.pdf> (参照
2020-12-10)

農林水産省 "畜産統計調査" 2019-11-13 (2019b)

<https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan/> (参照 2020-12-10)

農林水産省 "農業共済制度の概要" (2019c)

<https://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/kyosai/bukai/r010527/attach/pdf/index-14.pdf>
(参照 2020-12-10)

萩原慎一郎. 乳房炎ワクチン一斉接種における効果の検討. 家畜診療 2020; 67(12): 691-
695.

藤本恭子, 清水秀茂, 菊池允人, 松井崇, 伊藤貢, 橋本信一郎, 川原史也, 矢原芳博, 杉浦
勝明. 牛用および鶏用抗菌剤 ID リスト作成および DDD 値設定の試み. 日獣会誌 (査読
中)

松浦優, 鮎川理, 近藤寧子, 大谷夏輝, 菊池允人, 田中秀和. 子牛の難治性下痢症における
糞便微生物移植の試み. 家畜診療 2019; 66(1): 27-33.

松田真理, Kwan NCL, 川西路子, 小池良治, 杉浦勝明. 日本における家畜バイオマス重量あたりの抗菌剤使用量の評価：細井らの方法と EU の方法による評価結果の比較. 家畜衛生学雑誌 2017; 42(4): 191-197.

水之江義充. 院内感染とバイオフィルム. 耳鼻展望 2013; 56(4): 199-203.