

原著論文

自然発症した重症型牛大腸菌性乳房炎における カナマイシンとセファゾリンの乳房内併用投与の有効性

千徳芳彦¹⁾†、山本展司¹⁾

¹⁾ 北海道 NOSAI オホーツク統括センター 北見家畜診療所

〒099-0879 北海道北見市美園497-1

連絡担当者：千徳芳彦

TEL 0157-66-6702 FAX 0157-35-3911

E-mail yoshihiko_sentoku_bj@nosai-do.or.jp

【要約】

2013年から2016年、重症型の大腸菌性乳房炎（Coliform Mastitis: CM）自然発症例に対し、抗菌力の増加およびエンドトキシン遊離量の低下を期待しカナマイシンとセファゾリンの乳房内併用投与を無作為に行い生存時間分析を行った。その結果、初診後30日以内の死亡をエンドポイントとした場合では、併用群（KCZ群）ではセファゾリン単独投与群（対照群）に比較し生存率が有意に高く推移し（ $p=0.014$ ）、30日後の生存率は対照群の0.57（95%信頼区間：CI 0.33-0.75）に対しKCZ群では0.91（CI 0.68-0.98）であり、その死亡ハザード比は0.18（CI 0.04-0.85）であった。一方、初診後100日以内の除籍（淘汰含む）をエンドポイントとした場合では、両群の農場在籍率に有意差は認められなかった（対照群0.52（CI 0.30-0.71）、KCZ群0.71（CI 0.47-0.86）、 $p=0.125$ ）。生存曲線の形状からKCZ群の60日以降の淘汰例の増加が100日後の農場在籍率低下の原因として推察された。以上から、KCZ乳房内併用投与は自然発症の重症例において対照群よりも救命効果の高い治療法であることが示されたものの、生産性回復のためには不十分である可能性が示唆された。しかし、乳房内投与する抗菌剤の違いが自然発症した重症例の生存率に影響を及ぼす可能性のあることが示されたことから、重症例における抗菌剤乳房内投与の有用性について検討する価値があると考えられた。

キーワード：重症、大腸菌性乳房炎、乳牛、乳房内投与、併用投与

【緒論】

大腸菌性乳房炎（Coliform Mastitis: CM）における抗菌剤の乳房内投与（Intramammary administration: IMM）には否定的見解が多い。その理由として、*Escherichia coli* 感染の多くは自然治癒するためIMMの意義が少ないこと [10, 19, 30]、抗菌剤投与によるエンドトキシン（Et）遊離量増加、すなわち医原性Etの患者

への悪影響が懸念されること [9, 18, 26]、IMMの有益性を示した報告がほとんどないことが挙げられる [31]。しかし、自然発症例の重症型CMでは軽症例に比較し*E. coli*の感染期間は非常に長く [22, 34]、*Klebsiella* spp. 感染例ではさらに感染期間が長期化すること [21, 22, 33]、Et遊離量は暴露した抗菌剤の種類や濃度、投与方法によって異なることが近年明らかにされ [2, 9, 13, 18, 29, 38]、中等症以下の症例におけるIMMの有益性を示す報告もみられるようになった [22]。しかし、重症例における同様の報告は見当たらない。自然発症の重

受付：2023年8月7日

受理：2023年11月20日

症例では高率に菌血症を伴い [1, 35]、その由来は罹患分房であることが分子疫学的に示唆されているため [34]、その感染コントロール手段の1つとして全身投与 [31] のみならず IMM も検討する価値があると指摘されている [34]。

牛は Et 感受性が非常に高く [12]、加えて Et に対する生体反応が用量 - 時間依存性であることを考慮すれば [20, 25]、重症例に IMM する場合には菌数をより短時間で減少させ、かつ Et 遊離量がより少ない抗菌剤、およびその投与量や方法について慎重に選択する必要がある。しかし、牛への IMM が認可されている抗菌剤に関するこれらの情報は見当たらない。

著者は過去にカナマイシン (KM) とセファゾリン (CEZ) の併用により *E.coli* に対する抗菌力に相乗効果が認められ、かつ CEZ 単独暴露後に高値を示す Et 量を KM あるいはテトラサイクリン単独レベルまで低減できることを *in vitro* で確認し、その臨床応用の可能性について報告した [獣医学術学会北海道地区 2013]。本研究では、自然発症の重症型 CM 症例に対し KM と CEZ の併用 IMM を無作為に実施し、その有効性について CEZ 単独 IMM と比較検討した。

【材料と方法】

〈必要サンプル数の算出と分析後の検出力の検討〉

2 群の生存曲線の比較のためのサンプル数は以下の設定で求めた。すなわち、登録期間 3 年、試験期間 3 年 +100 日、各グループの予測生存率の年数 100 日、各グループの生存率 0.8、0.5、 α エラー 0.05、検出力 0.8、サンプルサイズ比 1、両側検定としたところ必要サンプル数は各群 19 頭と算出された。また、結果が有意でなかった場合には各事象の発生割合から検出力を求め、サンプル数の妥当性を検証した。すなわち、登録期間等は同前、各グループ生存率の結果とサンプル数、 α エラー 0.05、両側検定の設定で検出力を求めた。サンプル数の算出および検出力の確認には統計ソフト EZR v1.27 (R v3.1.1) [7] を用いた。

〈対象牛の選定〉

2013 年 9 月から 2016 年 11 月、当診療エリ

アにおいて診療依頼のあった急性 CM を疑う乳用牛の症例を対象とした。選定症例は筆者が初診から関与したものとし、systemic severity score system (SSS 法) [36] でスコア 6 以上、かつ、乳汁検査で大腸菌群の細菌が分離された症例とした。再発例、あるいは乳頭外傷、重度の乳頭炎など搾乳に明らかに支障のあるものは対象から除外することとした。

〈乳汁検体の微生物学的検査と薬剤感受性試験および本試験における大腸菌群の定義〉

乳汁検体は冷却材を入れた保冷容器によって搬入され、入手後 6 時間以内に 5% 羊血液加血液寒天培地 (バイタルメディア羊血液寒天培地、極東製薬工業株式会社) 上に滅菌綿棒で塗抹された。37 度 12 - 24 時間好氣的に培養し、コロニー数が 5 つ以上分離された場合に原因菌とし、分離されたグラム陰性菌は外部検査機関に菌種の同定と薬剤感受性試験を依頼した。同定検査は自動細菌同定検査装置 VITEC (シスメックス・ビオメリュー株式会社)、あるいは全自動微生物検査システム マイクロスキャン WalkAway Plus (ベックマン・コールター株式会社) により各機器に対応したグラム陰性菌用同定カードやパネル (アピベースの生化学的性状検査) を用いて実施され、感受性試験はディスク拡散法で実施された。

また、何らかの理由により外部検査機関に検体を提出できなかった場合には当診療所にてディスク拡散法により薬剤感受性試験を実施し (2011 Clinical and Laboratory Standards Institute 準拠: 腸内細菌科 阻止円 CEZ 23mm 以上、KM 18mm 以上を感受性とする)、簡易菌種推定法 [24] により菌種を推定した。大腸菌群の定義は *Escherichia coli*、*Klebsiella* spp.、*Enterobacter* spp.、*Citrobacter* spp. の 4 菌種とした。

〈投薬試験〉

(1) 無作為化方法と畜主への説明

治療方法は耳標を用いて無作為に選択した。すなわち、偶数の場合 KM-CEZ 併用 IMM 群 (KCZ 群)、奇数の場合 CEZ 単独 IMM 群 (対照群) とした。試験拒否の場合は分析から除外し、畜主が不在だった場合は対照群として分析

に含めることとした。試験の実施に当たっては畜主の意見を尊重することを第一とし、不都合があれば直ちに試験から離脱可能であることを説明した上で、KCZ 群には KM の使用禁止期間が長いことを十分説明した（試験当時の畜体の使用禁止期間は 50 日であったが 2018 年 12 月 21 日付けで 7 日間に改正された）。また、初診時には公平に処置するよう自身に課し、両群ともに頻回搾乳の重要性を試験開始時に畜主に説明し、計画外の介入の影響を最小限に抑えるよう努めた。

(2) 治療方法および KM-CEZ 併用 IMM 方法

初診時には両群ともに補液、非ステロイド性抗炎症剤および抗菌剤の全身投与を実施し、乳房洗浄は実施しないこととした。初診時には計画外介入を避けるために両群の治療内容に差がつかないように注意したが、2 診日以降は診療獣医師を不特定とし治療内容にも制約を設けなかった。KM と CEZ の併用方法は、同時に 1 日 1 回注入、あるいは両者を 1 日 2 回に分けて、KM 先行投与後 2 回目に CEZ 投与（例として朝 KM、晩 CEZ）、これを 3 日間実施した。対照群には CEZ を 1 日 1 回、3 日間投与した。乳房内投与薬は CEZ がセファゾリン LC「KS」（共立製薬株式会社、1 容器（4g）中 CEZ150mg（力価））、KM がカナマスチンデイスポ（Meiji Seika ファルマ株式会社、1 容器（3g）中ベンジルペニシリンプロカイン 300,000 単位、KM 硫酸塩 300mg（力価））あるいはタイニー PK（フジタ製薬株式会社、成分同）を用いた。

〈症例の背景と予後の調査〉

対象となった症例の年齢、初診時スコア、分娩後日数、分離菌種とその薬剤耐性状況、治療に関与した獣医師とその治療内容、および初診から 100 日以内の転帰（生存、死亡、淘汰）について調査した。転帰の確認はカルテシステムで行った後、牛の個体識別情報検索サービスを用いてチェックした。

(1) 除籍の定義

死亡の定義は「初診後 30 日以内に当該乳房炎が原因で死亡あるいは瀕死状態となり安楽殺

されたもの」、淘汰の定義は「初診から 100 日以内に淘汰されたもののうち当該乳房炎による生産性の低下が原因であることが記録あるいは畜主への聞き込みで確認できたもの、あるいは (2) の観察打ち切り例に該当にしないことが記録で確認できたもの」とした。除籍の定義は「死亡あるいは淘汰されたもの」とした。

(2) 観察打ち切りの定義

観察期間中、農場に在籍し続けた症例は観察打ち切りとした。死亡を目的変数（エンドポイント）とした分析の場合には観察期間中に淘汰された症例は観察打ち切りとした。合併症の治療経歴（重度の呼吸器、循環器、消化器、運動器疾患、不慮の事故、急死）が当該乳房炎前後にある症例で、それが転帰の直接的理由となったことが明らかな症例、あるいは老齢、繁殖障害などの理由により観察期間中に計画的に淘汰された症例は観察打ち切りとした。

〈生存時間分析〉

死亡、除籍をエンドポイントとし、初診時の治療別に生存曲線を比較分析した。得られた生存曲線を用いて両群の初診から 30 日後の生存率（1 - 死亡率）および 100 日後の農場在籍率（1 - 除籍率）を求めた。

〈統計解析〉

生存時間分析には Kaplan-Meier 法による生存曲線を用い、2 曲線の検定はログランク検定で実施した。有意であった場合には COX 比例ハザードモデルを用いてその 2 群間のハザード比を求めた。分析結果は $p < 0.05$ をもって有意とし、信頼区間はその区間に 1 をまたがない場合において有意とした。統計ソフトは EZR v1.27 (R v3.1.1) [7] を用いた。

【結果】

〈対象牛の選定〉

スコア 6 以上と判断され試験にエントリーした症例は 69 例だった（図 1）。その内、他の菌種による除外は対照群 13 例、KCZ 群 9 例であった。乳頭外傷や乳頭炎により除外された症例はなかった。試験拒否は 4 例でいずれも KCZ 群予定牛であり、使用禁止期間の長さが共通した

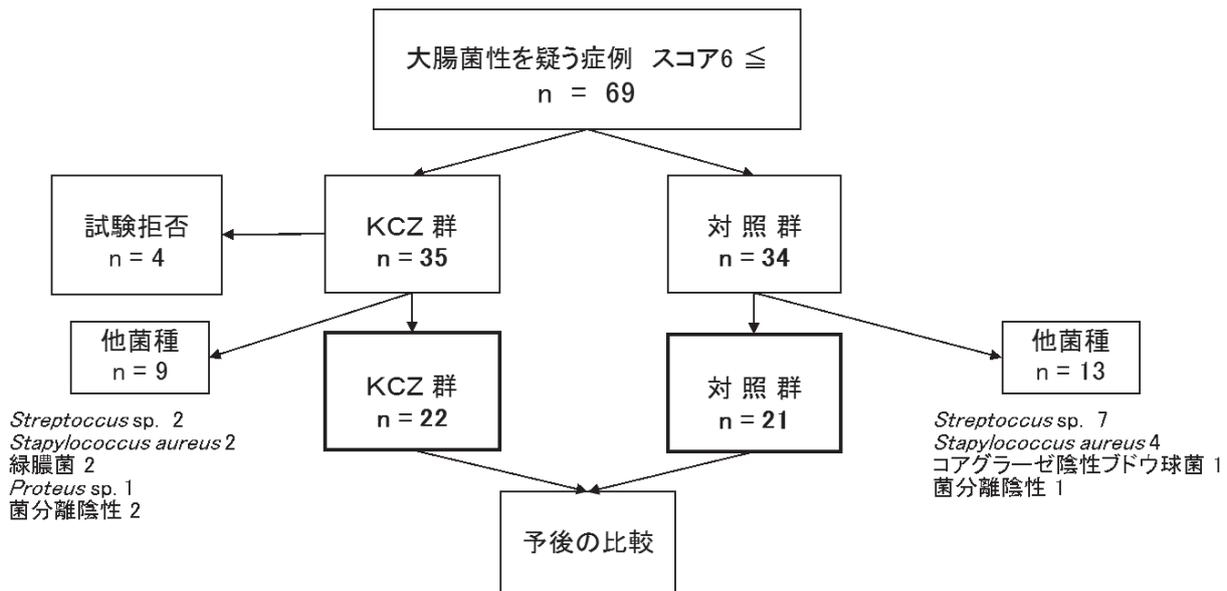


図1

拒否理由であった。その4例の内訳は死亡転帰1、淘汰転帰2であり、これらは分析から除外した。往診時に畜主が不在だった例はなかった。最終的に対照群21頭、KCZ群22頭が分析対象となった。

〈症例の背景〉

両群は年齢、スコア、分娩後日数および60日以内の頭数について同程度の値を示した(表1)。対照群で菌種同定検査が行われなかった症例が4例あったが、これらは簡易菌種推定法により *E.coli*、あるいは *Klebsiella* spp. と推定された。薬剤耐性状況を調査したところ、KM耐性菌は両群ともになく、CEZ耐性菌が対照群で2例(*K.pneumoniae* 1例、*Enterobacter cloacae* 1例)、KCZ群で1例(*K.pneumoniae*)認められた(表1)。対照群の *K.pneumoniae* の症例は死亡転帰となったが、その他の2例は治癒した。

治療には合計17名の獣医師が関与し、うち、KCZ群で17名、対照群で12名の獣医師が関与した。治療内容は初診時には両群ともに全例で補液と抗炎症剤、抗菌剤の投与が行われ、抗菌剤はKCZ群で22/22例、対象群で18/21例でKMが全身投与された。2診目以降も同様であり、初診、2診目ともに両群において同程度の処置が行われた(表2)。なお、KCZ群の2診目のエンロフロキサシン使用頻度が高

い傾向であったが、診療所の感受性検査でKM耐性が疑われた2例、解熱せず状態が悪かった1例、理由が不明な2例で使用されていた。3診目以降の治療内容についても両群で同様の治療内容であった(データ示さず)。なお、全ての症例で乳房洗浄は実施されなかった。

〈生存時間分析〉

何らかの理由による試験の中止例はなかった。KCZ群で淘汰予定牛が3例あったが、その内、2頭が観察期間中に淘汰されたため観察打ち切りとした。対照群では淘汰予定牛はいなかった。また、淘汰予定牛を除き乳房炎以外の理由により観察打ち切りとなった症例は両群ともになかった。

死亡をエンドポイントとした場合の30日後の生存率はKCZ群が0.909(95%信頼区間:CI 0.683-0.976)に対し、対照群で0.567(CI 0.333-0.747)であり、KCZ群で生存率は有意に高く推移した($p=0.0142$ 、図2)。その死亡ハザード比は0.1837(CI 0.0396-0.8518、 $p=0.03039$)であった。また、対照群の死亡例9例中8例は10日以内に死亡していた。

除籍をエンドポイントとした場合、KCZ群では60日以降の淘汰例増加により農場在籍率が低下する傾向が認められ、100日後の農場在籍率には有意な差は認められなかった(KCZ群0.711(CI 0.465-0.859)、対照群0.524(CI

表1 両群の基礎データ比較

		対 照 群	KCZ 群
		21頭	22頭
年 齢	中央値	5.0	4.3
	最小 - 最大	2.8 - 8.9	1.8 - 11.4
SCORE*	中央値	6	6
	最小 - 最大	6 - 9	6 - 9
分娩後日数	中央値	70	100
	最小 - 最大	0 - 436	5 - 373
	60日以内(頭)	9	8
菌 種 (株数)	<i>E.coli</i>	13	18
	<i>Klebsiella</i> sp.	2	3
	<i>E.coli</i> , <i>Klebsiella</i> 混合感染	1	1
	<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0
	未 同 定 **	4	0
薬剤耐性 (株数)	カナマイシン	0	0
	セファゾリン	2	1

* SSS法による全身症状スコア

** 官能検査および薬剤感受性より *E.coli* あるいは *Klebsiella* sp.と推定 [24]

表2 各群の治療内容の比較。2診目まで示す。

HSS: 高張食塩水、KM: カナマイシン、ENR: エンロフロキサシン、他: セファゾリン、アンピシリン、NSAIDs: フルニキシン、ジクロフェナク、SAIDs: デキサメサゾン。

治療内容の比較		対象 頭数	関与 獣医師 (名) 計 17	補 液		抗 菌 剤			抗 炎 症 薬		乳房 洗 浄	
				HSS	補液 5L以上	KM	ENR	他	NSAIDs	SAID s		
初 診 (頭)	KCZ群	22	1	22	22	4	22	0	0	21	0	0
	対 照 群	21	1	21	15	10	18	2	1	19	2	0
2 診 目 (頭)	KCZ群	21	10	20	22	2	14	5	2	15	0	0
	対 照 群	18	7	18	14	6	15	1	2	12	2	0

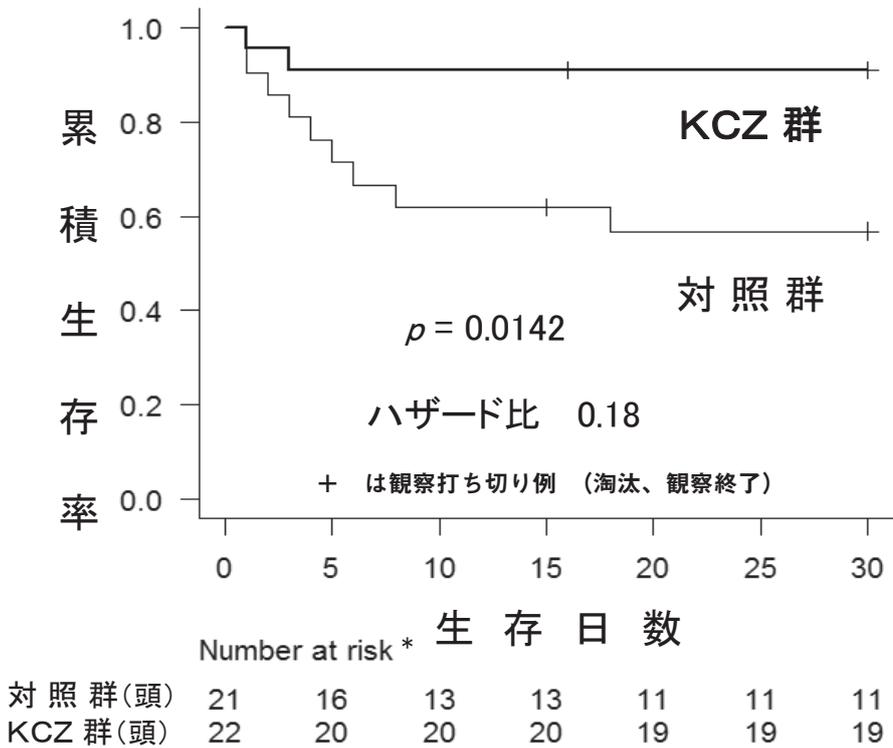


図2 死亡をエンドポイントにした場合の両群の生存曲線の比較
Number at risk: リスク頭数 (その時点で死亡するリスクがある頭数)

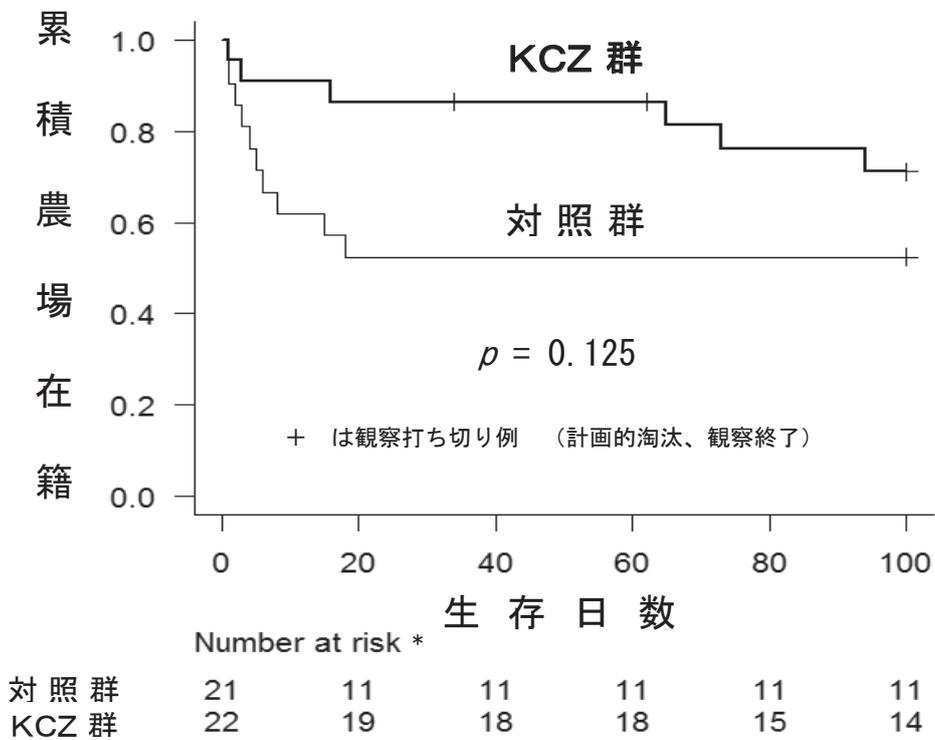


図3 除籍をエンドポイントとした場合の両群の生存曲線の比較
Number at risk: リスク頭数 (その時点で除籍されるリスクがある頭数)

0.297-0.709)、 $p = 0.125$ 、検出力 49%、図 3)。

【考察】

本研究は SSS 法により重症と評価した自然発症例に対する無作為化比較投与試験である。しかし、二重盲検のような厳格な投与試験とはしなかった。事前の説明がなされたため畜主は治療内容を知っており、治療内容はカルテに明記されているので 2 診目以降のすべての獣医師はどちらの群に分けられた症例を診察しているのか知ることができた。よって、本来の無作為化 (ランダム化) 比較試験とは異なり試験開始後のいくつかのバイアス、例えば畜主や獣医師の計画外の介入もあり得た。畜主においては頻回搾乳頻度や糞法などの看護処置に違いが生じた可能性があるが、これらの処置は日常的に行われていることであり、群分けを理由に意図的に処置を変更することは考え難い。また、獣医師においては、初診時には計画外介入とならないよう努めたが、2 診目以降の治療内容には倫理上、制約を設けなかったため何らかの偏りが生じた可能性は否定できない。臨床家は患者の臨床所見と畜主の稟告を考慮して治療内容を決断するため偏った介入は考え難いが、畜主の稟告が治療内容に影響した可能性はある。しかし、本試験では患者は無作為に振り分けられているためその影響は少ないと考えられ、また、2 診目以降には 17 名もの獣医師が関わっており実際に両群で同様の治療が施されていたことから、2 診目以降の治療内容の違いが今回の成績に影響を及ぼした可能性は低いと考えられた (表 2)。

試験拒否が KCZ 群予定牛で 4 例あったが、使用禁止期間の長さが共通した拒否理由であり、しばしば淘汰を考慮しなければならない本症において十分納得できる理由であった (試験当時の KM 乳房内注入剤の畜体の使用禁止期間は 50 日であった)。しかし、これらは特定の農家による拒否など何らかの偏りを生じる可能性があったため試験対象から除外した。もしもこの 4 頭を対照群として含めた場合には今回の試験結果に重大な影響を及ぼした可能性が高いと考える。

最終的に KCZ 群 22 例、対照群 21 例の CM 罹患乳牛が試験対象となった (図 1)。なお、

畜主の意見を尊重し不都合があれば治療内容を中途変更することもできたが試験中の KCZ 併用療法の中止例はなく、計画的淘汰を除き乳房炎以外の理由により観察打ち切りとなった症例も両群ともなかった。

また、表 1 の結果から両群は同程度の値を示したことから、群間の背景の違いが試験結果に影響した可能性は低いと考えられた。

CM における抗菌剤の IMM には否定的な見解が多く [10, 19, 31]、特に重症例における IMM の有益性を示した報告は見当たらない。研究デザインや重症度の評価方法が曖昧であったことが要因の 1 つとして指摘されているため [23, 31, 34, 36]、本報告ではその妥当性が詳細に検証されている SSS 法 [23, 34, 36] を用いて重症例を選別し、無作為に比較試験を行った。

抗菌剤を局所に投与することで医原性 Et による患者への悪影響が懸念されるが [9, 18, 26]、グラム陰性菌の Et 遊離量は暴露した抗菌剤の種類、濃度、併用の仕方により大きく異なることが近年明らかにされている [2, 13, 18, 29, 38]。しかし、牛に使用できる抗菌剤の選択肢は少なく [31]、例え承認外使用であっても牛への応用時の根拠にできるような報告は非常に少ない [4, 6, 28, 31]。

KM および CEZ はともに *E.coli* に対し殺菌的に作用するが [4, 16]、CEZ は β ラクタムであるため、アミノグリコシドである KM よりも Et 遊離量が多いと予測される [2, 13, 29, 38]。一方、KM は濃度低下による抗菌力の低下が著しく、乳汁中の脂肪小球などの乳成分存在下における抗菌力の低下も指摘されている [4]。実際のケースにおける乳房内での抗菌剤の分布や作用、細菌の活動に影響を与える要因は *in vitro* よりも複雑で予測しがたく [4, 15, 16, 31]、両抗菌剤ともに抗菌力を充分発揮できず Et 遊離量が予想より増加する状況 (Et 増加リスク) も考えられる。このような Et 増加リスクを軽減するためには両抗菌剤の投与方法 (投与量や投与間隔、併用など) について研究する必要があると思われたため、本研究では両抗菌薬の欠点を補うべく併用を検討することとした。

β ラクタムとアミノグリコシドの併用による相乗効果、すなわち殺菌力増強効果については

古くから報告があり、人ではグラム陰性菌性感染症に対してアミノグリコシドの持つ長い post antibiotic effect [11, 15, 37, 38] も利用した両者の併用が実施されている [14, 32, 37]。また、両者の併用による殺菌力増強の結果、菌体の死滅形態が変化し Et 遊離量が減少することも報告されている [3, 8, 18, 29]。しかし、牛では全身・局所にかかわらず抗菌剤併用療法についてほとんど検討されていない [4, 6, 31]。著者は過去に CEZ, KM 両者の併用により *E. coli* に対する相乗効果（抗菌力の増加と Et 量の減少）を確認している [獣医学術学会北海道地区 2013]。従って、CEZ, KM を IMM する場合にはそれぞれを単独で用いるよりも両者を併用する方が Et 増加リスクの軽減が期待できるため重症例の治療法として合理的であると考えられた。

これらの考えのもとに行われた今回の試験により、KCZ 群の 30 日以内の死亡ハザード（死亡リスク）は対照群の 1 / 5 であること、かつ、対照群の死亡例のほとんどが 10 日以内に死亡していることから KCZ IMM は CEZ IMM よりも救命効果が高いことが示され（図 2）、更に、IMM に用いる抗菌剤の違いが重症例の生存率に影響を及ぼすことも明らかとなった。KM 単独 IMM との比較がなされていないため KM と CZ の併用効果であることを明言できないが、KM は前述の通り乳汁内では不利な点が多いため CEZ IMM 例の死亡リスクを 1 / 5 にするほどの単独効果は疑わしく、KM と CEZ の併用効果と考える方が妥当だと思われた。

一方、100 日後の農場在籍率には両群に明らかな差を確認できなかった。検出力不足と判断されたため今後より例数を増やして検討する必要があるが、その生存曲線の形状から KCZ 群において生存例が使用禁止期間を待って淘汰されている状況が推察されたことから、KCZ IMM のみでは重症例の生産性を回復させることができなかった可能性が示唆された（図 3）。100 日後の農場在籍率の改善には併用方法の再検討（KM 先行投与 vs. 同時投与 [11]、投与量、投与期間）や乳房洗浄やステロイド局所投与 [26, 27] などの他の治療法との併用についても検討する必要があると考えられた。

なお、本研究では KM 単味製剤が入手困難

なことから現場での実用性を考慮し、市販のペニシリン（PC）・KM 合剤を使用した。*E. coli* は通常 PC に耐性を示すが受容体（penicillin-binding proteins）を保有している。よって、本研究結果に何らかの影響を及ぼしている可能性があるため、PC の影響について in vitro で確認する必要があると思われた。

今後は微生物学的治癒日数や Et 遊離量推移などの基礎的検討により併用効果を検証する必要があると思われた。また、KM 単独 IMM 例との比較により KCZ IMM の有益性をより明らかにするとともに、抗菌剤非投与例との比較により重症例における IMM の有益性について検討する必要があると思われた。なお、同様の効果を期待するためには当該地域あるいは農場の薬剤感受性について常にモニターしておく必要があると思われた。

本研究により自然発症の重症型 CM に対する KCZ IMM は CEZ IMM に比較しより救命効果が高いこと、更に、IMM に用いる抗菌剤の違いが重症例の生存率に影響を及ぼす可能性のあることを示すことができた。しかし、KCZ IMM のみでは重症例の生産性を回復させることはできない可能性も示された。重症例において生産性の回復がどの程度見込めるのか、そしてそれは治療法によってどれほど変わり得るのか、これらを明らかにするためには対象を重症例に限定した研究を行う必要があると思われた。

【謝辞】

本稿を終えるにあたり、忙しい業務の中ご協力頂いた北海道 NOSAI オホーツク統括センター 北見家畜診療所の皆さまに深謝いたします。

【参考文献】

- [1] Cebra, C. K., Garry, F. B., Dinsmore, R. P. 1996. Naturally occurring acute coliform mastitis in Holstein cattle. *J. Vet. Intern. Med.* 10(4):252-257.
- [2] Crosby, H. A., Bion, J. F., Penn, C. W., Elliott, T, S. 1994. Antibiotic-induced release of endotoxin from bacteria in vitro. *J. Med. Microbiol.* 40(1):23-30.
- [3] Dofferhoff, A. S., Esselink, M. T., de Vries-Hospers, H. G., van Zanten, A., Bom, V. J., Weits, J., Vellenga, E. 1993. The release of endotoxin from

- antibiotic-treated *Escherichia coli* and the production of tumour necrosis factor by human monocytes. *J. Antimicrob. Chemother.* 31(3):373-384.
- [4] Ganière, J. P., Denuault, L. 2009. Synergistic interactions between cefalexin and kanamycin in Mueller-Hinton broth medium and in milk. *J. Appl. Microbiol.* 107(1):117-125.
- [5] Goldberg, J. J., Bramley, A. J., Sjogren, R. E., Pankey, J. W. 1994. Effects of temperature and oxygen tension on growth of *Escherichia coli* in milk. *J. Dairy. Sci.* 77(11):3338-3346.
- [6] Goutalier, J., Combeau, S., Quillon, J. P., Goby, L. 2013. Distribution of cefalexin and kanamycin in the mammary tissue following intramammary administration in lactating cow. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 36(1):95-98.
- [7] Kanda, Y. 2013. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone. Marrow. Transplant.* 48(3):452-458.
- [8] 上洋司, 柴原健, 松島宏親. 1989. アミノ配糖体系抗生物質と β -ラクタム系抗生物質との *in vitro* 併用効果について. *Chemotherapy.* 37(11):1327-1333.
- [9] Kirikae, T., Nakano, M. and Morrison, D. C. 1997. Antibiotic-Induced endotoxin release from bacteria and its clinical significance. *Microbiol. Immunol.* 41(4). 285-294.
- [10] Leininger, D. J., Roberson J. R., Elvinger, F., Ward, D., Akers, R. M. 2003. Evaluation of frequent milkout for treatment of cows with experimentally induced *Escherichia coli* mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 222(1):63-6.
- [11] 松居都美, 津田良子, 上洋司, 加瀬公一郎, 山路真也, 室伏直美, 鳥屋実. 1995. 緑膿菌に対する isepamicin と imipenem/cilastatin 併用時の投与順序に関する基礎的検討. *Jpn. J. Chemother.* 143(6):91-98.
- [12] 南三郎. 2002. 壊疽性乳房炎. 新版 主要症状を基礎にした牛の臨床初版. (前出吉光, 小岩政照編). デーリイマン社, 札幌, pp706-707.
- [13] 中島靖之. 2006. 抗菌性物質による溶菌, 遊離菌体成分に対する生体反応と牛大腸菌性乳房炎. *家畜診療.* 53:461-471.
- [14] 日本版敗血症診療ガイドライン 2020 特別委員会. 2020. 日本版 敗血症診療ガイドライン 2020. *日集中医誌.* 28. Suppl. s68.
- [15] 農林水産省経営局. 2014. 1章 抗菌性物質の特性. 家畜共催における抗菌性物質の使用指針. (農林水産省編). 20 経営第 6633 号, 東京, pp2-20.
- [16] 農林水産省経営局. 2014. 5章 抗菌性物質の各論. 家畜共催における抗菌性物質の使用指針. (農林水産省編). 20 経営第 6633 号, 東京, pp63-64.
- [17] 農林水産省経営局. 2014. 6章 主な抗菌性物質適応症における標準的使用法. 家畜共催における抗菌性物質の使用指針. (農林水産省編). 20 経営第 6633 号, 東京, pp85-86.
- [18] Prins, J. M., Deventer, S. J. H., Kuijper, E. J., and Speelman, P. 1994. Clinical relevance of antibiotic-induced endotoxin release. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 38(6):1211-1218.
- [19] Pyörälä, S. H., Pyörälä, E. O. 1998. Efficacy of parenteral administration of three antimicrobial agents in treatment of clinical mastitis in lactating cows:487 cases (1989-1995). *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 212(3):407-412.
- [20] Rainard, P., Riollet, C. 2006. Innate immunity of the bovine mammary gland. *Vet. Res.* 37:369-400.
- [21] Schukken Y, Chuff M, Moroni P, Gurjar A, Santisteban C, Welcome F, Zadoks R. 2013. The "other" gram-negative bacteria in mastitis: *Klebsiella, serratia*, and more. *Vet. Clin. North. Am. Food. Anim. Pract.* 28(2):239-256.
- [22] Schukken, Y. H., Bennett, G. J., Zurakowski, M. J., Sharkey, H. L., Rauch, B. J., Thomas, M. J., et al. 2011. Randomized clinical trial to evaluate the efficacy of a 5-day ceftiofur hydrochloride intramammary treatment on nonsevere gram-negative clinical mastitis. *J. Dairy. Sci.* 94(12):6203-15.
- [23] 千徳芳彦, 山本展司, 橘泰光, 田幡欣也. 2020. 様々な飼養形態と規模の農場における急性大腸菌性乳房炎罹患牛への Systemic Severity Score system の適用とその妥当性の検証. *産業動物臨床医誌.* 11(2):57-65.
- [24] 千徳芳彦, 大久保宏平. 2017. 牛乳汁由来グラム陰性桿菌の簡易菌種推定の試み—臨床疫学的、公衆衛生学的分類とその簡易グループ推定法—. *家畜感染症学会誌.* 6(1):21-28.
- [25] Shangraw, E. M., Rodrigues, R. O., Witzke, M. C., Choudhary, R. K., Zhao, F. Q., McFadden, T. B. 2020. Intramammary lipopolysaccharide infusion induces local and systemic effects on milk components in lactating bovine mammary glands. *J. Dairy. Sci.* 103(8):7487-7497.
- [26] 篠塚康典, 平田晴美, 中谷啓二, 石橋一郎, 大川雄三. 2008. 乳牛の大腸菌性乳房炎に対する初回治療時抗生物質無投与療法の検討. *家畜診療.* 55:501-509.
- [27] Shinozuka, Y., Hirata, F., Ishibashi, I., Okawa, Y., Kasuga, A., Takagi, M., Taura, Y. 2009. The therapeutic efficacy of mammary irrigation regimen

- in dairy cattle diagnosed with acute coliform mastitis. *J. Vet. Med. Sci.* 71(3):269–273.
- [28] 篠塚康典. 2016. 抗菌剤の使用にともなうエンドトキシン放出と急性大腸菌性乳房炎. *家畜診療*. 63:149-157.
- [29] Sjölin, J., Goscinski, G., Lundholm, M., Bring, J., Odenholt, I. 2000. Endotoxin release from *Escherichia coli* after exposure to tobramycin: dose-dependency and reduction in cefuroxime-induced endotoxin release. *Clin. Microbiol. Infect.* 6(2):74-81.
- [30] Suojala, L., Simojoki, H., Mustonen, K., Kaartinen, L., and Pyörälä, S. 2010. Efficacy of enrofloxacin in the treatment of naturally occurring acute clinical *Escherichia coli* mastitis. *J. Dairy. Sci.* 93(5):1960-1969.
- [31] Suojala, L., Kaartinen, L., Pyörälä, S. 2013. Treatment for bovine *Escherichia coli* mastitis – an evidence-based approach. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 36(6):521-531.
- [32] Swedish Reference Group for Antibiotics. 2013. Rational use of aminoglycosides-review and recommendations by the Swedish Reference Group for Antibiotics (SRGA). *Scand. J. Infect. Dis.* 45(3):161-175.
- [33] Todhunter, D. A., Smith, K. L., Hogan, J. S., Schoenberger, P. S. 1991. Gram-negative bacterial infections of the mammary gland in cows. *Am. J. Vet. Res.* 52(2):184-188.
- [34] Wenz, J. R., Barrington, G. M., Garry, F. B., Dinsmore, R. P, Callan, R. J. 2001. Use of systemic disease signs to assess disease severity in dairy cows with acute coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218(4):567-572.
- [35] Wenz, J. R., Barrington, G. M., Garry, F. B., McSweeney, K. D., Dinsmore, R. P., Goodell, G., Callan, R. J. 2001. Bacteremia associated with naturally occurring acute coliform mastitis in dairy cows. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 219(7):976-981.
- [36] Wenz, J. R., Garry, F. B., Barrington, G. M. 2006. Comparison of disease severity scoring systems for dairy cattle with acute coliform mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 229(2):259-62.
- [37] William, A. C. 2011. Optimizing Aminoglycoside Use. *Crit. Care. Clin.* 27(2011):107–121.
- [38] 山口聖賀, 佐藤節子, 鳥屋実. 1999. 緑膿菌からのエンドトキシン遊離に及ぼす Isepamicin 及び β -ラクタム薬の影響. *Jpn. J. Antibiot.* 52(1): 41-56.

Efficacy of intramammary administration of kanamycin and cefazolin in spontaneously cases of severe *E. coli* mastitis in cows

Yoshihiko Sentoku^{†1)}, Hiroshi Yamamoto¹⁾

¹⁾Kitami Veterinary Clinic, Okhotsk Control Center,
Hokkaido Agricultural Mutual Aid Association
(497-1 misono, kitami-shi, Hokkaido 099-0879)
Correspondence to YOSHIHIKO SENTOKU
TEL 0157-66-6702 FAX 0157-35-3911
E-mail yoshihiko_sentoku_bj@nosai-do.or.jp

[Abstract]

From 2013 to 2016, we randomly administered intramammary combinations of kanamycin (KM) and cefazolin (CEZ) to spontaneous cases of severe coliform mastitis (CM) in the hopes of increasing antibacterial activity and reducing endotoxin release, and also performed to analysis the survival time after treatment. As a result, when the end point was death within 30 days after the first visit, the survival rate remained significantly higher in the combination group (KCZ group) than in the cefazolin monotherapy group (control group) ($p=0.014$). The survival rate after 30 days was 0.57 (95% confidence interval: CI 0.33-0.75) in the control group and 0.91 (CI 0.68-0.98) in the KCZ group, and the hazard ratio for death was 0.18 (CI 0.04-0.85). On the other hand, when the end point was expulsion (including culling) within 100 days after the first visit, there was no significant difference in the farm retention rate between the two groups (control group 0.52 (CI 0.30-0.71), KCZ group 0.71 (CI 0.47-0.86), $p= 0.125$). From the shape of the survival curve, it was inferred that the increase in the number of culled cases after 60 days in the KCZ group was the cause of the decrease in the farm retention rate after 100 days. The above results indicate that intramammary combined administration of KCZ is a more effective treatment than the control group in spontaneously occurring severe cases, but it is suggested that it may not be sufficient for restoring productivity. However, it has been shown that differences in the antibiotics administered intramammary may affect the survival rate of spontaneously occurring severe cases, so it is worth considering the usefulness of intramammary administration of antibiotics in severe cases.

Keywords: coliform mastitis, combination, intramammary administration, naturally occurring, severe