

# 管内大規模農場における牛マイコプラズマ乳房炎の発生と

## 清浄化に向けた新たな取り組み

○中村光、中山 恵、今村友子、林健  
(長野県伊那家畜保健衛生所)

### はじめに

牛マイコプラズマ乳房炎の主要な原因菌種は *Mycoplasma bovis* (*M.bovis*) であり、成牛で乳房炎以外に膣炎、子牛で肺炎、中耳炎を引き起こす病原微生物である。*M.bovis* が持つ可変表面タンパクは、誘導された抗体に対し遺伝的な組換えを行い、液性免疫から逃れる。このため、宿主細胞内での長期生存を容易にし、難治性乳房炎を引き起こす。また、*M.bovis* は、細菌検査での培養速度が遅く同定までに1～4週間を要するため、発生農場において乳房炎がまん延し、甚大な経済的損失を招く恐れがある。近年、積極的な導入を行う大規模農場において *M.bovis* の発生が増加しており、関連性が注目されている[1,2,3]。

今回、管内の *M.bovis* が摘発された規模拡大中の大規模農場で清浄化に向けて行った対策と新たな試みについて概要を報告する。

### 経過

2021年6月に管内酪農家を対象とした、酪農生産性向上対策事業におけるマイコプラズマの摘発を目的にしたバルク乳スクリーニング検査を実施した。規模拡大中の当該農場における3基のバルクタンクの全てからマイコプラズマを疑うコロニーを検出し、PCR検査にて *M.bovis* 陽性と同定された。7月に陽性個体把握のため、搾乳牛全頭検査(368頭)を実施し、*M.bovis* 陽性牛30頭を摘発した。8月にマイコプラズマ対策検

討会を行い、陽性牛を病畜群へ隔離し、慢性的な乳房炎症状を示す個体は随時淘汰した。また、薬剤感受性試験及び菌種同定試験を実施した。乾乳牛及び導入牛については、分娩後個体乳検査を行い、11月に清浄性確認のため、2回目の搾乳牛全頭検査(447頭)を行った。旧バルクタンク(2t、3t、6t)から新バルクタンク(10t×2)への変更に伴いスクリーニング検査の感度調査を実施した。また、新たな試みとして血清を用いたELISA法を2回実施し、抗体検査の有用性を検討した。現在も対策は継続中であるが、今回2021年12月までの報告を述べる。なお、この農場では、2012年に *M.bovis* が分離され、2013年に清浄化されている経緯がある。

### 農場概要

当該農場は、規模拡大中であり、2020年から2021年にかけて農場概要が大きく変更された(表1)。

表1 農場概要

	2020年	2021年 (8月時点)
飼養頭数	420頭	529頭
搾乳頭数	320頭	368頭
従業員数	12人	24人
牛舎・牛床数	2棟・4床	4棟・8床 (7月から)
飼養形態	フリーバーン	
バルクタンク数 (容量)	3基 (11t)	2基 (20t)
搾乳システム	パラレルパーラー	ロータリーパーラー (9月稼働)

## バルク乳 スクリーニング検査

### 材料及び方法

当該農場におけるバルクタンク 3 基からバルク乳を採材し、マイコプラズマ（NK）液体培地（関東化学株式会社）に 100  $\mu$ L 添加し 37°C、5~10%CO<sub>2</sub>条件下で 3 日間の増菌培養を行った。次に培養液をマイコプラズマ（NK）寒天培地（関東化学株式会社）に 1 エーゼを塗抹し、同条件下で 7 日間の分離培養を行った。倒立顕微鏡（NIKON）を用いて、コロニーが観察された検体については、液体培地から InstaGene DNA 精製マトリックス（BIO-RAD）を使用し、DNA 抽出を行った。Chávez González らが用いた 16S rRNA 上の V2、V6 領域に基づくプライマーを使用し、PCR 検査により *Mycoplasma* 菌種同定を行った[4][5]。

### 結果

当該農場における全てのバルク乳からニップル状コロニーが分離され、PCR 検査により *M.bovis* と同定された（図 1）。



図 1 分離されたコロニー

## マイコプラズマ 対策検討会

### 農場の現状及び指導

農場では、泌乳停止などの激しい症状

を示す個体がない事と急な淘汰が難しい事から、*M.bovis* 陽性牛を病畜群に隔離した。陽性牛の内、慢性的な乳房炎症状が見られる個体については淘汰、乳量の大きな減少が見られない個体については、後述の薬剤感受性一塩基多型（SNP）解析及び微量液体希釈法の結果を踏まえた治療を指導した。また、新たに牛舎を建設したことで、群数を増加させ群密度を低下させた。

## 搾乳牛全頭検査 （7月、11月）

### 材料及び方法

陽性牛特定のため 7 月、搾乳牛 368 頭の個体乳をバルク乳スクリーニング検査と同様の手法で細菌分離及び同定検査を行った。また陽性牛隔離後の清浄性確認のため 11 月、搾乳牛 447 頭の個体乳を新たに採材し同検査を行った。

### 結果

7 月の搾乳牛全頭検査では、368 頭中 30 頭（8%）の *M.bovis* 陽性牛を摘発した（表 2）。また 11 月の搾乳牛全頭検査では、447 頭中の 27 頭（6%）を新たに摘発した。27 頭中 25 頭が、病畜群内の個体であり、病畜群全体の 51%（25/49 頭）を占めていた（表 3）。

表 2 7 月全頭搾乳牛検査結果

搾乳群	頭数	陽性数	陽性率
1群	90	1	1%
2群	75	0	0%
3群	64	2	3%
4群	65	0	0%
5群 (病畜群)	74	27	36%
合計	368	30	8%

表3 11月全頭搾乳牛検査結果

搾乳群	頭数	陽性数	陽性率
1群	70	1	1%
2群	72	1	1%
3群	43	0	0%
4群 (病畜群)	49	25	51%
5群	74	0	0%
6群	70	0	0%
7群	69	0	0%
合計	447	27	6%
※陽性牛は新規陽性牛のみ			

### 分娩後個体乳検査

#### 材料および方法

搾乳牛全頭検査時に検査が出来なかった乾乳牛および新たな導入牛に対して分娩後の初乳を用いて同様に細菌分離・同定検査を実施した。

#### 結果

4ヶ月間実施し、196頭中新たに4頭摘発した(表4)。

表4 分娩後個体乳検査結果

採材月	頭数	陽性数	陽性率
8	97	2	2%
9	55	1	2%
10	20	1	5%
11	24	0	0%
合計	196	4	2%

### M.bovis 株薬剤感受性試験 および由来調査

#### 材料及び方法

2012年分離株と2021年分離株の計12株(個体乳由来9株、バルク乳由来3株)を用いて、SNP解析および微量液体希釈法による薬剤感受性試験、

Pulsed - Field Gel Electrophoresis (PFGE) 解析、Multi Locus Sequencing Typing (MLST) 解析によるシークエンスタイプ (ST) の同定を行った。SNP 解析: Hata らが行った Hybridization Probe による融解曲線解析により SNP を検出した[6]。微量液体希釈法: Hannan が改良した方法により抗菌剤に対する感受性を最小発育阻止濃度測定試験 (MIC 試験) にて確認し、SNP 解析との相関性を調べた[7]。PFGE 解析: McAuliffe.L らに準拠した方法により抽出した DNA を制限酵素 *SmaI* 及び *MluI* によって切断し、パルスパターンを確認した[8]。MLST 解析: 7種のハウスキーピング遺伝子上の変異を Register らが用いた方法に準拠して DNA 解析を行い、MLST 解析サイト (<http://pubmlst.org/mbovis/>) にてシークエンスタイプ (ST) を特定した[9]。

#### 結果

SNP 解析: テトラサイクリン系薬剤と16員環マクロライドの感受性低下 SNP (*rrs* A965、*rrs* A967、*rpl* G748) は、全株で認められ、フルオロキノロン系薬剤に対する感受性低下 SNP (C248T、G239T) は、2021年分離株のみ *gycA* および *parC* の2つの遺伝子に認められた。一方、マクロライド系薬剤全般ならびにリンコマイシン系薬剤感受性低下 SNP (*rpl* A2058、A2059)、スペクチノマイシン感受性低下 SNP (*rrs* C1192) は認められなかった(表5)。微量液体希釈法: SNP 解析と相関性が見られ、マクロライド系薬剤全般ならびにリンコマイシン系薬剤に感受性を示した(表6)。PFGE 法: 2012年分離株計3株は同一のパルスパターン (A1) を示し、2021年分離株計9株も同一のパルスパターン (A2) を示した(表7)。MLST 解析: 2012年分離株計3株は ST21、2021年分離株計9株は、ST19 と解析された。(表7)。

表5 薬剤感受性 SNP 解析結果

SNP	2012年	2021年	
	個体乳	個体乳	バルク乳
TET	rrs A965,A967		
SPC	低感受性SNPなし		
16MML	rrl G748		
MML&LCM	低感受性SNPなし		
FQ	gycA	C248T	
	parC	低感受性SNPなし	G239T

(TET：テトラサイクリン、SPC：スペクチノマイシン、16MML：16員環マクロライド、MML&LCM：マクロライド&リンコマイシン、FQ：フルオロキノロン)

表6 微量液体希釈法結果

検体No.	薬剤 (MIC (μg/ml) ・判定)						
	KM	SPC	ERFX	FF	OTC	LCM	TS
①	50	6.3	25	12.5	12.5	1.6	50
	R	S	R	R	R	S	R
②	50	6.3	25	12.5	12.5	1.6	25
	R	S	R	R	R	S	R
③	>100	12.5	25	12.5	12.5	1.6	50
	R	S	R	R	R	S	R
④	50	3.1	25	6.3	12.5	1.6	25
	R	S	R	R	R	S	R
⑤	>100	3.1	25	12.5	12.5	1.6	25
	R	S	R	R	R	S	R

(KM：カナマイシン、SPC：スペクチノマイシン、ERFX：エンフロキシサシン、FF：フロルフエニコール、OTC：オキシテトラサイクリン、LCM：リンコマイシン、TS：タイロシン)

表7 PFGE、MLST 解析結果

分離年	PFGE		MLST	
	Sma I	Mlu I	tkf	ST
2012年 (3株)	A1		6	21
2021年 (9株)	A2		1	19

10t バルクタンクに  
おけるスクリーニング  
検査感度の調査

材料および方法

農場のバルクタンクが10tタンクへ変更後、バルク乳スクリーニング検査を2回実施した。1回の検査において、同一検体を用い細菌分離、同定検査を5回行った。

結果

12/9の検体では5回中2回、12/16の検体では5回中1回 *M.bovis* が検出された(表8)。

表8 10t バルクタンクでの *M.bovis* 検出結果

10tバルクタンクでの マイコプラズマ検査結果			
検査日	回数	コロニー形成	PCR検査
12/9	1回目	×	-
	2回目	○	+
	3回目	×	-
	4回目	○	+
	5回目	×	-
12/16	1回目	×	-
	2回目	×	-
	3回目	×	-
	4回目	×	-
	5回目	○	+

抗体検査 (8月、11月)

材料及び方法

全頭搾乳牛検査で摘発された *M.bovis* 陽性牛を含む病畜牛群及び乾乳牛群に対し血清学的調査を行った。8月に病畜群26頭(内、*M.bovis* 陽性牛21頭)と乾乳群111頭及び抗体量の推移調査として11月に *M.bovis* 陽性牛24頭について、P81 ELISA法[10]を実施した。P81 ELISA法は、吸光値から *M.bovis* の特異的膜タンパク質に対する抗体の定量を行い

、抗体量から過去の感染歴を調査する検査方法であり、カットオフ値は、 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$  である。結果に関しては、t 検定を行い有意水準 5%以下 ( $p < 0.05$ ) を有意とした。

### 結果

8月の抗体検査では、病畜群内においてPCR検査陽性牛の抗体量は、優位 ( $p < 0.05$ ) に高値を示し (図2)、22/26頭 (84.6%) がPCR検査と抗体検査の結果が一致した (表9)。また、乾乳群における75%の個体が抗体陰性を示した

(図3)。11月の抗体検査では、多くの個体で抗体量の低下が見られ、抗体上昇を示した個体はいなかった。また抗体陽性を8月から11月まで示した個体は14頭であった (図4)。

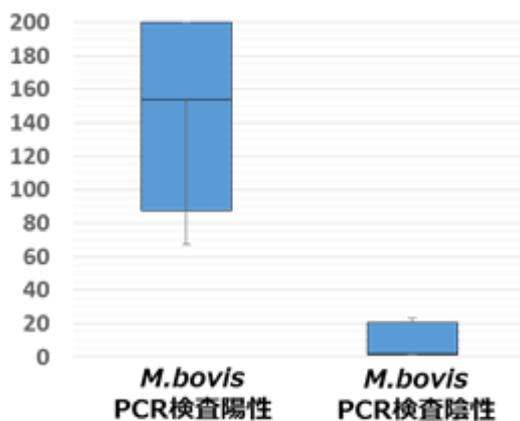


図2 8月病畜群内抗体量比較

表9 病畜群におけるPCR検査と抗体検査の比較

		PCR検査	
		陽性(21頭)	陰性(5頭)
抗体検査	陽性(21頭)	19	2
	陰性(5頭)	2	3

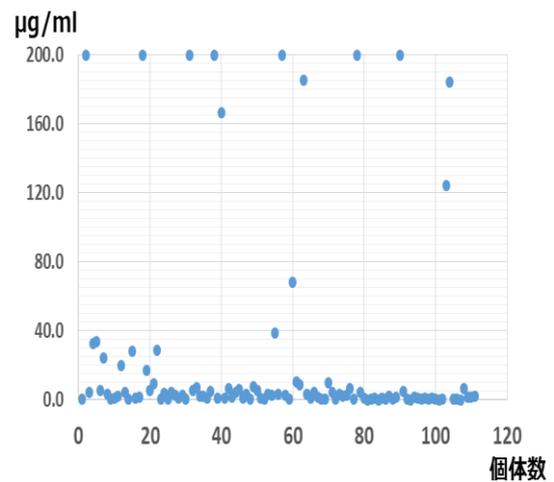


図3 乾乳群抗体量

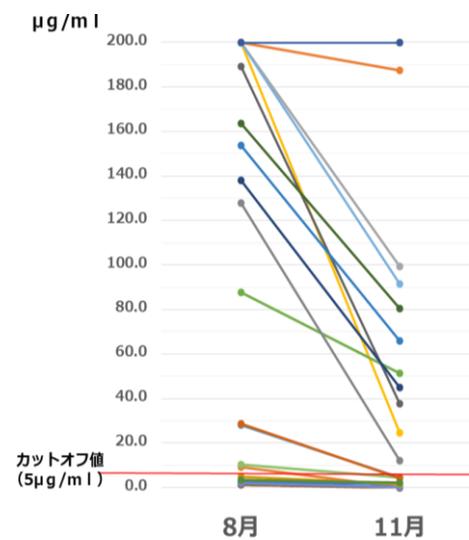


図4 抗体量の推移

### 考察

当該農場は、2012年に *M.bovis* がバルク乳スクリーニング検査で検出され、継続的な対策により2013年に清浄化されたが、2021年4月から8月にかけて月30頭以上を導入し、規模を拡大していた中、再び *M.bovis* が検出された。新たに分離された菌株の侵入ルート特定及び治療薬の選択のために行った、薬剤感受性SNP解析、PFGE解析及びMLST解析の結果から2021年分離株は、2012年分離株と同一株ではなく、草場ら[11]が述べているように、規模拡大のための新規導入牛と共に *M.bovis* が農場へ侵入した

ことが強く示唆された。

*M.bovis* は、乳汁だけでなく接触感染によって伝播する特徴を持ち、特に免疫力の低下している病畜群における発生率は、正常群と比較して170倍高いという報告もある[12][13]。当初、摘発された陽性牛を *M.bovis* が原因ではない乳房炎罹患牛と同じ牛群で隔離飼育したことで、群内に感染が拡大したと考えられた。今回の事例から発生農場において搾乳衛生の徹底だけでなく、感染牛の隔離方法がまん延防止対策上、重要な要因であると言える。

*M.bovis* に対する有効な衛生対策技術として、バルク乳の定期的なスクリーニング検査が最も広く普及しているが、陽性牛の排菌量の差があるため、10t バルクタンクのように容量が大きくなる程、検査感度が低くなることが考えられる[14]。今回の感度調査から、10t バルクタンクでは、マイコプラズマスクリーニング検査の感度は低く、検査頻度だけでなく検査回数の増加や分割検査を行い、スクリーニング検査を清浄性確認の手段ではなく排菌量の多い牛の摘発を目的とした位置付けにするべきだと考えられた。

衛生学的対策の新たな一手段として実施した血清学的抗体検査[10]は、従来から実施されている培養法よりも迅速な診断ができ、抗体価からPCR検査よりも感染牛の早期摘発ができることが示唆された。また、8月から11月にかけて抗体量の推移により、全ての陽性個体で抗体量の減少が見られたことから隔離対策の結果、新規感染牛が減少したと思われる。

当該農場では、P81ELISA法及びPCR検査を組み合わせた対策を行った結果、12月時点で新たに陽性牛は摘発されておらず、本手法が有効であったと言える。

検討課題としてP81ELISA法は新しい手法であり、現状は、研究室内の使用に限定されている。今後、市販化され一般

的な検査として活用されることが望まれる。

最後に本調査を実施する上でご協力いただいた、農研機構動物衛生研究所および酪農学園大学獣医衛生学ユニットに感謝する。

#### 引用文献

[1]川畑由夏ら：マイコプラズマ性乳房炎の清浄化対策推進による大規模酪農経営体の健全経営支援（岩獣会報 Vol. 38, 66-69, 2012）

[2]草場信之：北海道における牛マイコプラズマ性乳房炎の現状（臨床獣医, 2010, 6）

[3]樋口豪紀：マイコプラズマに対する牛の免疫学的応答性とその特徴（臨床獣医, 2021, 10）

[4]全国家畜衛生職員会：病性鑑定マニュアル第4版（P178, 179）

[5] Y R Chávez González ら：In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR (Vet Microbiol . 1995 Nov;47(1-2):183-90.)

[6]Eiji Hata ら：Relationship between Antimicrobial Susceptibility and Multilocus Sequence Type of *Mycoplasma bovis* Isolates and Development of a Method for Rapid Detection of Point Mutations Involved in Decreased Susceptibility to Macrolides, Lincosamides, Tetracyclines, and Spectinomycin (Applied and Environmental Microbiology, 17 June 2019, Vol. 85, No. 13)

[7] P C Hannan : Guidelines and recommendations for antimicrobial minimum inhibitory concentration (MIC) testing against veterinary mycoplasma species. International Research Programme on Comparative Mycoplasmaology (Vet Res. Jul-Aug 31 2000;31:373-95)

- [8] Laura McAuliffe ら : Molecular epidemiological analysis of *Mycoplasma bovis* isolates from the United Kingdom shows two genetically distinct clusters (J Clin Microbiol. 2004 Oct;42)
- [9] Resister KB ら : Comparison of Two Multilocus Sequence Typing Schemes for *Mycoplasma bovis* and Revision of the PubMLST Reference Method (J Clin Microbiol, 58, 2020)
- [10] 樋口ら : 牛マイコプラズマ感染症における血清抗体価の評価 (家畜衛生学雑誌 第47巻第1号, 2021)
- [11] 草場ら : 北海道における牛マイコプラズマ性乳房炎の発生とその疫学的考察 (日本獣医師会雑誌 67巻1号, 2014)
- [12] 安富 : マイコプラズマ性乳房炎発生農場に対するコントロール (臨床獣医, 2010, 6)
- [13] Incidence and transmission of *Mycoplasma bovis* mastitis in Holstein dairy cows in a hospital pen: A case study (V Punyapornwithaya ら : Vet Med, 2011, 6)
- [14] 山川 : マイコプラズマ性乳房炎～清浄化に向けた取り組みから学んだこと～ (北海道酪農技術セミナー2018, [http: / / yubetsu-gyugyn. com](http://yubetsu-gyugyn.com))