

日本国内における牛の呼吸器感染性

Mycoplasma の浸潤状況調査上村涼子[†] 中森健太郎 末吉益雄

宮崎大学農学部 (〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1)

(2011年7月21日受付・2012年6月19日受理)

要 約

2010年8～12月に国内11道県の26農場の子牛194頭の鼻腔ぬぐい液から *Mycoplasma* 属菌の分離を試みた。その結果、25農場 (96.2%) 146頭 (75.3%) が陽性 (*M. bovis* 90頭, *M. bovirhinis* 62頭及び *M. alkalescens* 16頭) であった。呼吸器症状または外耳下垂有症牛とその同居牛群の *M. bovis* 分離率 (54.3%) は、無症状牛群のそれ (26.8%) より有意に高かった。*M. bovis* 分離率及び有症率は、2～3カ月齢で高く、分離率に品種差はなかったものの、有症率はホルスタイン種が黒毛和種及び交雑種に比較して有意に高かった。

——キーワード：牛呼吸器複合病 (BRDC), 外耳下垂, *Mycoplasma*.

----- 日獣会誌 65, 871～875 (2012)

牛呼吸器複合病 (BRDC) は、種々のウイルスや細菌の混合感染によって引き起こされる呼吸器症の総称であり、子牛における死産率の高さから経済的損失をもたらす疾病の上位に位置している [1-3]。BRDC原因菌の一つとして、*Mycoplasma bovis* は非常に重要であり [1, 3, 4]、本菌が分離されたBRDCは国内外で散発し、コントロールの重要性が指摘されている [2-6]。しかしながら、その浸潤状況は報告されていない。そこで今回、国内の農場において、牛の鼻腔ぬぐい液をスワブにて採材し、市販のマイコプラズマ用培地を用いて *Mycoplasma* 属菌の分離・同定を試みた。

2010年8～12月に国内11道県 (北海道, 山形, 宮城, 千葉, 愛知, 兵庫, 岡山, 愛媛, 高知, 鹿児島, 沖縄) の26農場194頭 (1日齢～15カ月齢, 黒毛和種84頭, ホルスタイン種35頭, 交雑種75頭) から鼻腔ぬぐい液を採取した。試料はマイコプラズマ用液体培地 (ミヤリサン製薬株, 東京) に接種し、冷蔵下で輸送した。本培地は、乳房炎の牛の乳試料からの *Mycoplasma* 分離に用いられているが [7]、呼吸器からの *Mycoplasma* 属菌の分離に供試した報告はない。当該試料を新しいマイコプラズマ用液体培地及びM-broth [8] に接種し、37℃, 2～5日間好気増菌培養した。また、送付された試料から直接DNAを抽出し、*Mycoplasma* 属を特異的に検出するプライマー (GPO-3; 5'-GGGAGCAAA

CAGGATTAGATACCCT-3', MGSO; 5'-TGCACC ATCTGTCCTCTGTTAACCTC-3') [9]、を用いて、採取した鼻腔ぬぐい液中の *Mycoplasma* 属遺伝子を検出した。

培養後の増菌液をマイコプラズマ用寒天培地 (ミヤリサン製薬株, 東京) [7] 及びM-agar [8] に接種し、37℃, 5% CO₂ 下で2～5日間培養後、発育したコロニーを釣菌・継代してクローニングした。菌種の同定は、生化学的性状検査及び菌種特異的プライマーを使用したPCR法で実施した [10, 11]。PCR法で使用したプライマーは、*M. bovis* (Mbv-F; 5'-TTTTAGCTCTTTTTG AACAAAT-3', Mbv-R; 5'-GGCTCTCATTAAGAA TGTC-3') [10], *M. alkalescens* (Mak-F; 5'-GCT GTTATAGGGAAAGAAAAC-3', Mak-R; 5'-AGA GTCCCTCGACATGACTCG-3') [11] 及び *M. bovirhinis* (Mbr-F; 5'-GCTGATAGAGAGGTCTATCG-3', Mbr-R; 5'-ATTACTCGGGCAGTCTCC-3') [11] をそれぞれ特異的に検出するものであった。

76検体について前述した2種の培地を使用し、分離率及び分離菌種について比較した。さらに118検体については、マイコプラズマ用液体培地及び寒天培地のみを使用した。*Mycoplasma* 属菌の分離率及び感染個体の有症率の95%信頼区間を、フリー統計ソフトウェア「R」(R Development Core Team, <http://www.R-project>.

[†] 連絡責任者：上村涼子 (宮崎大学農学部獣医学科産業動物衛生学研究室)

〒889-2192 宮崎市学園木花台西1-1 ☎ FAX 0985-58-7283 E-mail: uemuray@cc.miyazaki-u.ac.jp

表1 有症牛飼養農場と無症牛飼養農場由来鼻腔ぬぐい液からの *Mycoplasma* 属菌分離率の比較

	農場数	採材頭数	<i>Mycoplasma</i> 分離陽性率 (%) (95%信頼区間)	菌種別分離陽性率 (%) (95%信頼区間)			分離陰性率 (%)
				<i>M. bovis</i>	<i>M. bovirhinis</i>	<i>M. alkalescens</i>	
				呼吸器症状または 外耳下垂症状 がある農場	17	138	
上記の症状 のない農場	9	56	33/56 58.9% (45.9-70.8)	15/56 26.8% (17.0-39.6)	18/56 32.1% (21.4-45.2)	1/56 1.8% (0.0-9.6)	23/56 41.1% (29.2-54.1)
	26	194	146/194 75.3% (68.7-80.8)	90/194 46.4% (39.5-53.4)	62/194 32.0% (25.8-38.8)	16/194 8.2% (5.1-13.0)	48/194 24.7% (19.2-31.3)

表2 牛の鼻腔ぬぐい液からの *Mycoplasma* 属菌分離率の症状別比較

菌種	<i>Mycoplasma</i> 分離陽性率 (%) (95%信頼区間) n = 194	症状別 <i>Mycoplasma</i> 分離陽性率 (%) (95%信頼区間)		
		呼吸器症状 (+) n = 64	外耳下垂 (+) n = 16	無症状牛 n = 127
		<i>M. bovis</i>	90/194 46.4% (39.5-53.4)	43/64 67.2% (55.0-77.4)
<i>M. bovirhinis</i>	62/194 32.0% (25.8-38.8)	17/64 26.6% (17.3-38.5)	4/16 25.0% (7.3-52.4)	43/127 33.9% (26.2-42.5)
<i>M. alkalescens</i>	16/194 8.2% (5.1-13.0)	6/64 9.4% (4.4-19.0)	3/16 18.8% (4.0-45.6)	9/127 7.1% (3.8-12.9)
全体	146/194 75.3% (68.7-80.8)	58/64 90.6% (81.0-95.6)	15/16 93.8% (71.7-98.9)	85/127 66.9% (58.4-74.5)

org.) を用い、2項分布に基づいて推定し、信頼区間の重なりのないものを有意な差とみなした。

調査した26農場194頭のうち、25農場(96.2%)、180頭(92.8%)から、*Mycoplasma*属の遺伝子が検出され、うち146頭(75.3%)から*Mycoplasma*属菌が分離された。34頭については、*Mycoplasma*属遺伝子検出のみで、菌は分離されず、また菌種特異的プライマーによる検出も陰性であった。分離された菌種は、*M. bovis*が最も多く(90頭46.4%)、続いて*M. bovirhinis*(62頭32.0%)及び*M. alkalescens*(16頭8.2%)の順であった。76検体について、市販のマイコプラズマ用液体培地及び寒天培地と従来のM-broth及びM-agarを使用して分離率を比較した。その結果、*Mycoplasma*の分離率はともに64.5%(49/76)であり、菌種別でも分離率はすべて等しく、*M. bovis*42.1%(32/76)、*M. bovirhinis*23.7%(18/76)及び*M. alkalescens*0.0%(0/76)であったが、*M. bovirhinis*については、1種類の培地でのみ分離されたものが各1検体あり、それはともに

*M. bovis*も同時に分離された検体であった。牛の呼吸器官に*Mycoplasma*属菌が感染した場合、呼吸器症状及び外耳下垂を呈することが報告されている[3, 6, 12, 13]。これらの症状の認められた農場(有症牛群)と認められなかった農場(無症牛群)で比較したところ、有症牛群では無症牛群よりも*M. bovis*の分離率が有意に高かったが、*M. bovirhinis*及び*M. alkalescens*ではこのような差は認められなかった(表1)。国内では、牛の肺炎原因菌を特定する目的で、有症牛及びその同居牛の呼吸器から*Mycoplasma*属菌を分離した報告は過去にあるが、症状の有無に関わらず*Mycoplasma*属菌の浸潤状況を調査した報告はわれわれの知るかぎり本報告が最初である。

個体別では、呼吸器症状を呈した牛64頭中43頭(67.2%)、外耳下垂を呈した牛16頭中10頭(62.5%)から*M. bovis*が分離されたが、これは無症牛からの分離率(37.0%, 47/127)よりも有意に高率であった。一方、*M. bovirhinis*及び*M. alkalescens*では、症状の

表3 *Mycoplasma bovis* 分離率と有症率の月齢別・品種別比較

月 齢	<i>M. bovis</i> 分離陽性率(%) (95%信頼区間)	<i>M. bovis</i> 分離陽性個体の 有症率(%) (95%信頼区間)	
		呼吸器症状(+)	外耳下垂(+)
～1M	21/60	5/21	0/21
	35.0%	23.8%	0.0%
	(24.2-47.6)	(10.6-45.1)	(0.0-13.1)
2～3M	51/79	29/51	10/51
	64.6%	56.9%	19.6%
	(53.6-74.2)	(43.3-69.5)	(11.0-32.5)
4～5M	10/22	6/10	0/10
	45.5%	60.0%	0.0%
	(26.9-65.3)	(31.3-83.2)	(0.0-25.9)
6～15M	8/33	3/8	0/8
	24.2%	37.5%	0.0%
	(12.8-41.0)	(8.5-75.5)	(0.0-31.2)
品 種			
黒 和	30/84	8/30	0/30
	35.7%	26.7%	0.0%
	(26.3-46.4)	(14.2-44.4)	(0.0-9.5)
交雑種	43/75	21/43	1/43
	57.3%	48.8%	2.3%
	(46.1-67.9)	(34.6-63.2)	(0.1-12.3)
ホルスタ イン種	17/35	14/17	9/17
	48.6%	82.4%	52.9%
	(33.0-64.4)	(59.0-93.8)	(31.0-73.8)
全 体	90/194	43/90	10/90
	46.4%	47.8%	11.1%
	(39.5-53.4)	(37.8-58.0)	(6.1-19.3)

有無による分離率の差は認められなかった(表2)。有症牛群と同居している無症状牛からの *M. bovis* 分離率(45.1%, 32/71)が、無症状牛群のそれ(26.8%, 15/56)よりも高い傾向にあった。

M. bovis について月齢別の分離率及び分離陽性牛の有症率をみると、2～3カ月齢で最も分離率及び有症率が高くなっていた(表3)。*Mycoplasma* 性肺炎の発症には、幼齢期の移動や取り扱いのストレスが深く関わっており、発症個体では鼻汁中の *M. bovis* 数が上昇し、周囲への感染のリスクを高めることが報告されている[13]。また、*M. bovis* 感染個体と同居した群では、1週間以内に群内に感染が浸潤し、2週間ほどで発症するとされている[13]。今回の結果から、*M. bovis* が関与した呼吸器病の制御に対して、この2～3カ月齢期の飼養管理が重要であることが示唆された。

M. bovis の分離率及び有症率を牛の品種別にみると、分離率に品種間差はなかったが、呼吸器症状または外耳下垂の有症率はホルスタイン種が黒毛和種及び交雑種に比べて高かった(表3)。このことについて、最も有症率

の高かった2～3カ月齢前後の哺乳あるいは離乳、カーフハッチ個別飼育あるいは群飼等の子牛の飼養環境の違い、*Mycoplasma* 性乳房炎の発生状況について検討する必要がある。

今回の調査では、外耳下垂を呈した牛16頭中15頭の鼻腔スワブ検体から *Mycoplasma* 属菌が分離され、最も多く分離された菌種は *M. bovis* (62.5%) であった(表2)。外耳下垂有症牛のうち11頭(68.8%)がホルスタイン種であり、これらはすべて2カ月齢であった。また12頭(75.0%)は呼吸器症状も併発していた。本調査では、中耳炎あるいは外耳炎について確認していなかったが、Lammら[12]は、米国での調査において、*Mycoplasma* 性中耳炎が1～2カ月齢の乳牛で有意に高く、うち77%が肺炎も併発しており、耳から分離された *Mycoplasma* 属菌の84%が *M. bovis* であったことを報告している。本調査でも同様の結果が得られた。また、Maedaら[6]は、外耳下垂を呈した牛の耳腔及び鼻腔から同時に *M. bovis* が分離されることを報告しており、耳腔と鼻腔の採取部位別分離率及び分離菌種の違いをさらに検討する必要はあるが、外耳下垂有症牛の起因菌分離を試みる際に、鼻腔ぬぐい液を材料とすることは、採材の容易さからも有用である可能性がある。

今回の調査の結果、有症牛群における *M. bovis* の高い浸潤率が認められたと同時に、無症状牛群でも、*Mycoplasma* 属菌が58.9% (うち *M. bovis* は26.8%) から分離され、過去の報告[14]に比較して *Mycoplasma* 属菌が広く国内の牛飼養農場に浸潤していることが明らかとなった。また、*M. bovis* の分離率及び有症率に、月齢差、品種差があることも示唆された。近年、呼吸器症状を呈した牛の気管から高率に *M. bovis* が分離される事例が報告[15, 16]され、BRDCを診断する上で本菌の検出は必要不可欠と考えられる。今回の成績は本菌の関与するBRDCコントロールの一助になると考えられた。また、本菌の調査が進展しないことの一理由の一つに、分離培地の作製の煩雑さがあるが、本調査において、76検体について2種の培地で分離率及び分離菌種の比較調査を実施した結果、それらの培地間で違いは認められず、市販のマイコプラズマ用培地が牛の呼吸器からの *M. bovis*、*M. bovirhinis* あるいは *M. alkalescens* の分離に有用であることが示された。一方で、供試検体から *Mycoplasma* 遺伝子は検出されたにもかかわらず、菌が分離されなかったものについて、検体中の *Mycoplasma* が死滅していたこと他に、本試験で使用した培地は、*M. dispar* または *Ureaplasma* の培養には適していないため、病変部にこれらが存在していても、分離されなかった可能性も考えられた。*Ureaplasma diversum* や *M. dispar* は、牛での肺炎起病性が確認されており[13]、わが国においても1970年代に集団保育

された乳用雌牛の肺炎病変から *Ureaplasma* が高率に分離されること [17] やその病理像の報告がなされているが [18], 今日のBRDCとの関連は不明である。今後は、これらの菌種も含め、総合的に調査を進める必要がある。

以上のことから、今回の調査では、*M. bovis* が国内に高度浸潤していることが明らかとなり、その浸潤状況に月齢差・品種差がある可能性が考えられた。また、今後の調査を行う上で、市販の調製済みマイコプラズマ用培地を利用することは、煩雑な培地調製を省略でき、特に肺炎起病菌として重要な *M. bovis* について野外調査が進み、対策に関する知見が多く得られるものと期待される。

最後に、本調査における試料採取にご協力いただいた方々に深謝する。

引用文献

- [1] Griffin D : Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 13, 367-377 (1997)
- [2] Hirose K, Kawasaki Y, Kotani K, Tanaka A, Abiko K, Ogawa H : Detection of *Mycoplasma* in Mastitic by Milk by PCR Analysis and Culture Method, *J Vet Med Sci*, 63, 691-693 (2001)
- [3] Nicholas R, Ayling R : *Mycoplasma bovis* : disease, diagnosis, and control. *Res Vet Sci*, 74, 105-112 (2003)
- [4] Arcangioli M, Duet A, Meyer G, Dernburg A, Bezille P, Poumarat F, Grand D : The role of *Mycoplasma bovis* in bovine respiratory disease outbreaks in veal calf feedlots. *The Vet J*, 177, 89-93 (2008)
- [5] 工藤竜大, 廣嶋精哉, 塚原敬典, 坂本 崇, 平野孝昭, 中田 豊 : *Mycoplasma alkalescens* と *Mycoplasma bovis* が分離された牛の肺炎例, *日獣会誌*, 47, 311-314 (1994)
- [6] Maeda T, Shibahara T, Kimura K, Wada Y, Sato K, Imada Y, Ishikawa Y, Kadota K : *Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves, *J Comp Path*, 129, 100-110 (2003)
- [7] Higuchi H, Iwano H, Kawai K, Ohta T, Obayashi T, Hirose K, Ito N, Yokota H, Tamura Y, Nagahata H : A simplified PCR assay for fast and easy mycoplasma mastitis screening in dairy cattle, *J Vet Sci*, 12, 191-193 (2011)
- [8] Kobayashi H, Morozumi T, Munthali G, Mitani K, Ito N, Yamamoto K : Macrolide susceptibility of *Mycoplasma hyorhinis* isolated from piglets, *Antimicrob Agents Chemoth*, 40, 1030-1032 (1996)
- [9] Van Kuppeveld FJM, Van Der Logt JTM, Angulo AF, Van Zoest MJ, Quint WGV, Niesters HGM, Galama JMD, Melchers WJG : Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 2604-2615 (1992)
- [10] Rifatbegović M, Assunção P, Poveda J, Pasić S : Isolation of *Mycoplasma bovis* from the respiratory tract of cattle in Bosnia and Herzegovina, *Vet Rec*, 160, 484-485 (2007)
- [11] Kobayashi H, Hirose K, Worarach A, Paugtes P, Ito N, Morozumi T, Yamamoto K : *In Vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovigenitalium* by PCR, *J Vet Med Sci*, 60, 1299-1303 (1998)
- [12] Lamm C, Munson L, Thurmond M, Barr B, George L : *Mycoplasma* otitis in California calves, *J Vet Diagn Invest* 16, 397-402 (2004)
- [13] 永友寛司 : 子牛のマイコプラズマ肺炎, マイコプラズマとその実験法, 尾形 学監修, 第1版, 111-119, 近代出版, 東京 (1988)
- [14] Hirose K, Kobayashi H, Ito N, Kawasaki Y, Zako M, Kotani K, Ogawa H, Sato H : Isolation of Mycoplasmas from nasal swabs of calves affected with respiratory diseases and antimicrobial susceptibility of their isolates, *J Vet Med*, 50, 347-351 (2003)
- [15] Thomas A, Ball H, Dizier I, Trolin A, Bell C, Mainil J, Linden A : Isolation of *Mycoplasma* species from the lower respiratory tract of healthy cattle and cattle with respiratory disease in Belgium, *Vet Rec*, 151, 472-476 (2002)
- [16] Nicholas RAJ : Bovine mycoplasmosis : silent and deadly, *Vet Rec*, 168, 459-462 (2011)
- [17] Yamamoto K, Harasawa R, Ogata M, Miura T, Nakane H : Bacteriological examination of bovine pneumonic lungs in Japan, *Jpn J Vet Sci*, 38, 7-14 (1976)
- [18] Ogiso Y, Yamamoto K, Goto N, Takahashi R, Fujiwara K : Pathological studies on bovine pneumonia in special reference to isolation of mycoplasmas, *Jpn J Vet Sci*, 38, 15-24 (1976)

Investigation of Respiratory Infectious *Mycoplasmas* in Cattle in Japan

Ryoko UEMURA^{*†}, Kentaro NAKAMORI and Masuo SUEYOSHI

** Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, 1-1 Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki, 889-2192, Japan*

SUMMARY

Mycoplasmas were isolated from nasal swabs taken from 194 cattle raised on 26 farms in 11 prefectures in Japan from August to October 2010. A total of 146 cattle (75.3%) on 25 farms (96.2%) tested positive for the isolation of *mycoplasmas*, with *M. bovis* in 90 cattle, and *M. bovirhinis* and *M. alkalescens* in 62 and 16 cattle, respectively. The isolation rate of *M. bovis* in herds with respiratory and/or drop ear symptoms was higher than that in asymptomatic herds. The incidence of respiratory and/or ear drop symptoms and isolation rates of *M. bovis* were higher in 2 to 3 month-old calves than in other age groups. Differing isolation rates of *M. bovis* were not observed among Japanese black, Holstein, and crossbred cattle, although the incidence of respiratory and/or drop ear symptoms was higher in Holstein cattle. — Key words : BRDC, drop ear, *Mycoplasma*.

† Correspondence to : Ryoko UEMURA (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

1-1 Gakuenkibanadai-nishi, Miyazaki, 889-2192, Japan

TEL · FAX 0985-58-7283 E-mail : uemurary@cc.miyazaki-u.ac.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 65, 871 ~ 875 (2012)