

## 千葉県で確認された牛マイコプラズマ性乳房炎の 発生状況と清浄化対策

石山 大<sup>1)†</sup> 佐藤弘泰<sup>1)</sup> 井上宣子<sup>1)</sup> 小川明宏<sup>2)</sup>  
松本敦子<sup>3)</sup> 清水秀茂<sup>1)</sup>

- 1) 千葉県農業共済組合連合会西部家畜診療所関宿出張所 (〒270-0213 野田市桐ヶ作 462-11)
- 2) 千葉県中央家畜保健衛生所 (千葉庁舎) (〒262-0011 千葉市花見川区三角町 656)
- 3) 千葉県中央家畜保健衛生所 (佐倉庁舎) (〒285-0072 佐倉市岩富町 497)

(2013年4月11日受付・2013年11月8日受理)

### 要 約

2011年6月、1酪農家において難治性乳房炎が連続して発生し、千葉県で初となる牛マイコプラズマ性乳房炎と確認した。発症牛からは *Mycoplasma bovis* が分離され、呼吸器症状 (4/5)、乳房の浮腫感 (4/5)、複数分房の罹患 (5/5) を認めた。さらに乳汁の一般細菌検査では菌分離陰性 (4/4) という特徴があった。搾乳牛全頭のマイコプラズマ検査を行った結果、12% (6/50) の保菌率であった。保菌牛を隔離し、抗生物質による治療を行い、うち2頭を淘汰したところ、2011年12月以降のバルク乳のモニタリング検査でマイコプラズマ陰性となった。本事例は、外部より導入した初妊牛が *M. bovis* を保菌し、分娩後に感染を拡大させたと考えられた。このため、導入牛の多い地域では、バルク乳を用いたマイコプラズマ検査を定期的に行う必要があると考えられる。

——キーワード：牛マイコプラズマ性乳房炎、清浄化対策、*Mycoplasma bovis*。

----- 日獣会誌 67, 188~192 (2014)

牛マイコプラズマ (Mp) 性乳房炎は経済損失が大きい伝染性乳房炎であり、近年の牛群の大規模化に伴い国内外ともに発生は増加傾向にある [1-3]。北海道では2006年以降、年間約10件の発生が報告されており [1]、外部より牛を導入する機会の多い農家では留意すべき疾病の一つである。

今回、1酪農家において呼吸器症状を伴う難治性乳房炎が連続して発生し、調査した結果、千葉県で初めて Mp 性乳房炎を確認した。そこで発生状況と実施した清浄化対策と管内酪農家の Mp 浸潤状況について報告する。

### 材料及び方法

**発生の概要：**発生農場は成乳牛59頭をフリーストール牛舎にて飼養する1酪農家で、飼育牛の全頭が北海道からの導入牛である。搾乳は2名で行い、前搾りの後、消毒用アルコールで乳頭を清拭しミルカー装着を行って

いる。ミルカー離脱後は、0.5%ヨード剤 (ポビーコート5<sup>TM</sup>, 株野澤組, 東京) によるポストディップを実施している。

2011年5月に1頭 (牛A)、6月に4頭 (牛B~E) が乳房炎軟膏による治療で治癒しないと往診依頼があった。当該牛の乳房炎乳汁について好気培養下で一般細菌検査を行った。6月中旬に Mp 性乳房炎を疑い、牛B、C、Dの乳汁及びバルク乳の Mp 検査を後述の方法で実施した。

**細菌学的検査：**牛の乳汁サンプルは、酵素基質培地 (クロモアガーオリエンタシオン<sup>®</sup>, 関東化学株, 東京)、5%羊血液寒天培地 (日水製薬株, 茨城) 及び食塩卵黄加寒天培地 (日水製薬株, 茨城) に塗抹し、24~48時間好気培養した。嫌気培養は実施しなかった。

Mp 検査では検体を Mp 用液体培地 (DNA 添加変法 Hayflick 培地またはマイコプラズマ NK 培地<sup>®</sup>, 関東化学株, 東京) にて増菌後、Mp 用平板寒天培地 (DNA

† 連絡責任者：石山 大 (千葉県農業共済組合連合会西部家畜診療所関宿出張所)

〒270-0213 野田市桐ヶ作462-11 ☎04-7196-0005 FAX 04-7196-0146 E-mail: daimode@gmail.com

表1 *Mycoplasma bovis* 保菌牛の治療概要

牛	導入年月	2011年5~7月 <sup>1)</sup> の治療		2011年10月の治療		予 後 治癒判定
		全身投与	治療 <sup>2)</sup> 回数	全身投与	治療回数	
A	2010年3月	CEZ, ABPC	7	OBFX	3	2011年11月淘汰
B	2009年2月	ABPC, CEZ, OBFX	11	—	0	2011年11月隔離解除
C	2009年9月	ABPC	6	—	0	2011年11月隔離解除
D	2010年12月	OBFX	6	—	0	2011年11月隔離解除
E	2006年6月	OBFX	3	OBFX	3	2012年3月隔離解除
F	2006年8月	—	0	—	—	2011年9月淘汰

CEZ：セファゾリン，ABPC：アンピシリン，  
OBFX：オルビフロキサシン

- 1) 乳房内注入薬は乳房炎軟膏（SP合剤，セファゾリン，カナマイシン）に加え，6月18日以降にオルビフロキサシンまたはエンロフロキサシンの薬液を適宜注入するよう指示した。
- 2) 抗生物質の全身投与の治療回数

添加変法 Hayflick 培地またはマイコプラズマNK 寒天培地<sup>®</sup>，関東化学(株)，東京)にて10% CO<sub>2</sub> 下で培養した。また，液体培地の培養液から市販の試薬（Instagene<sup>®</sup>，BioRad，U.S.A.）を用いてDNAを抽出し，*Mycoplasma bovis*，*M. bovirhinis*，*M. alkarese*，*M. bovigenitalium* の16S rRNAを標的遺伝子としたPCR検査を実施した [4, 5]。搾乳牛50頭及び管内酪農家全26戸のバルク乳のMp検査（培養法及びPCR法）は日本動物特殊診断(株)に依頼した。また，乳汁Mp陽性牛4頭の鼻腔拭い液サンプルのMp検査（PCR法）は，酪農学園大学獣医学部獣医衛生学ユニットに依頼した。

**薬剤感受性試験：**分離された *M. bovis* 2株及び標準株 (Donetta 株) について，マイクロプレートを用いた微量液体希釈法による最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。フロルフェニコール (FP)，チアンフェニコール (TP)，チルミコシン (TMS)，エリスロマイシン (EM)，オキシテトラサイクリン (OTC)，タイロシン (TS)，エンロフロキサシン (ERFX) 及びオルビフロキサシン (OBFX) の8剤を試験薬剤とし，0.25~256 µg/ml に段階希釈し発育阻止された最小濃度を MIC 値とした [6]。

**Mp 性乳房炎と診断後の対策：**6月中旬に行った初めてのMp検査により，牛B，C，Dの乳房炎乳汁及びバルク乳から *M. bovis* が分離されたため，6月末に搾乳牛全50頭の乳汁及び牛B，C，D，Eの鼻腔拭い液についてMp検査を行った。

搾乳牛全50頭のMp検査により，*M. bovis* が検出された6頭（牛A~F）のうち，牛A~Eは抗生物質の全身投与による治療を行った（表1）。なお，Mp性乳房炎を疑って以降の治療として，牛Aは10月に，牛B，D，Eは6月にOBFX（1~2g/head，3~4days）の全身投与を行った。牛Eは10月の乾乳期にもOBFX（1.5g/head，3days）の全身投与を行った。牛C，Fはニューキノロン製剤の全身投与は行わなかった。局所治療として，6~7月に牛A~Fに対しOBFXまたはERFXの乳房内注入（1~2g/lの薬液で50ml/回）を指示した。

清浄化対策として，*M. bovis* 保菌牛は他の牛と接触のないよう隔離し，最後に搾乳を行うこととした。衛生対策として逆性石鹸によるパーラー内の消毒を実施した。

**モニタリング：**清浄化対策後のモニタリングのため，Gonzalezら [7] の方法を参考に2日間隔で3度採取したバルク乳と *M. bovis* 保菌牛の個体乳のMp検査を実施した。モニタリングは2011年8月から2012年10月までに計8回行った。また，バルク乳の体細胞数を2010年10月から2012年3月まで毎月3回調査した。

**管内農場調査：**管内酪農家のMp性乳房炎浸潤状況を調査するために，2012年1月に管内酪農家全26戸のバルク乳のMp検査を行った。また，牛の導入状況もあわせて調査した。

## 結果及び考察

千葉県で初めてMp性乳房炎の発生を確認した。発症牛は，食欲不振（5/5），39.5℃以上の発熱（3/5），呼吸器症状（4/5），乳房の腫脹（5/5），乳房の硬結（4/5），乳房の浮腫感（4/5），複数分房の罹患（5/5），一般細菌検査陰性（4/4）を示し，ABPC，CEZの全身投与及びSP合剤，CEZ，カナマイシンの乳房炎軟膏での治療に反応しない難治性乳房炎であった。これらは過去に報告 [1-3, 8] されているMp性乳房炎の特徴に合致していた。Mpは一般細菌検査では培養できず適切な培地を用いる必要がある [2, 9]。よって，乳汁一般細菌検査で菌分離陰性の乳房炎のうち，乳房や乳汁の局所症状に加え，畜主の稟告や呼吸器症状，関節炎の有無等によりMp性乳房炎を疑う場合，Mp検査を積極的に実施する必要があると思われる。

Mp性乳房炎の発生を確認後，搾乳牛全頭のMp検査を行ったところ，牛A，E，Fから新たに *M. bovis* が検出され，50頭中6頭（12%）が *M. bovis* 保菌牛（牛A~F）であると判明した。国内での *M. bovis* によるMp性乳房炎発生例では1.8~34.8%の農場内保菌率が報告されており [12]，今回の発生では比較的早期にMp性乳房炎を発見できたものと思われる。また，鼻腔拭い液からのMp検査の結果，牛Cから *M. bovirhinis* が検出

表2 薬剤感受性試験結果（最小発育阻止濃度：MIC測定法）

	牛B株	牛D株	標準株 (Donetta株)
FP	32	32	8
TP	32	32	16
TMS	256<	256<	2
EM	128	128	256
OTC	32	32	2
TS	64	64	0.5
ERFX	4	2	1
OBFX	8	8	1

単位：μg/ml

FP：フロルフェニコール，TP：チアンフェニコール，  
TMS：チルミコシン，EM：エリスロマイシン，  
OTC：オキシテトラサイクリン，TS：タイロシン，  
ERFX：エンロフロキサシン，  
OBFX：オルビフロキサシン

表3 乳汁中の*Mycoplasma bovis*検査結果

牛	2011年				2012年				
	6月	8月	9月	10月	12月	1月	3月	6月	10月
A	+ <sup>2)</sup>	-	+	+	(11月 淘汰)				
B	+	-	-	-	nt	nt	nt	(淘汰)	
C	+	-	-	-	nt	nt	nt	(淘汰)	
D	+	-	-	-	nt	nt	nt	nt	nt
E	+	-	nt <sup>3)</sup> (乾乳)	- (乾乳)	-	-	-	nt	(9月 淘汰)
F	+	-	(淘汰)						
バル <sup>1)</sup> ク乳	+	-	-	-	-	-	-	-	-

- 1) モニタリング期間のうち2011年8月～2012年3月は、隔離牛A～F由来乳汁を含まない。
- 2) 「+」は*Mycoplasma bovis*が検出・分離されたことを示す。
- 3) nt = not tested

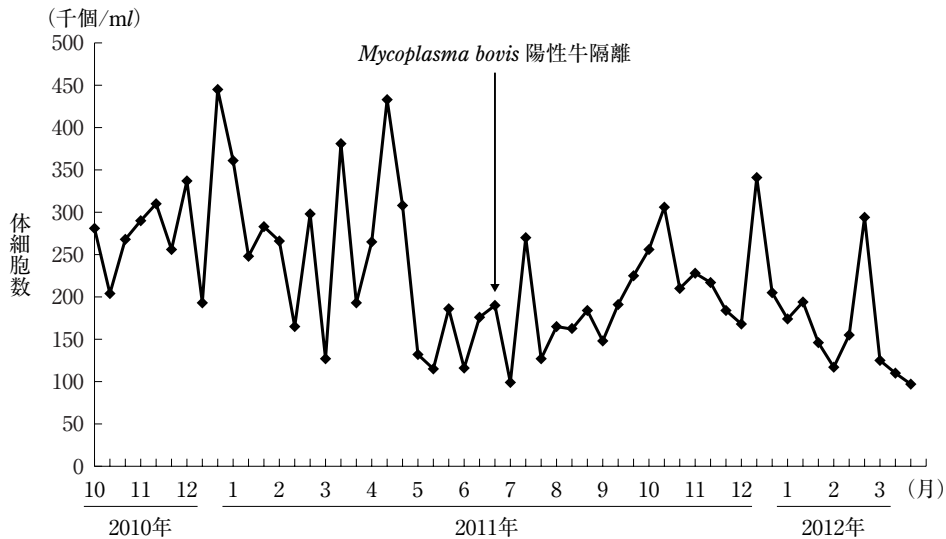


図 2010年10月から2012年3月までの発生農場におけるバルク乳検査の体細胞数の推移

されたが、牛B, D, EからはMp属の菌は検出されなかった。Mp性乳房炎の感染経路は、肺炎、関節炎等の病巣からの下向性感染と、搾乳器具または環境のMpが乳頭口から感染する上向性感染が知られている [2, 3]。呼吸器症状を呈していたMp性乳房炎罹患牛の鼻腔拭い液から*M. bovis*は検出されなかったことから、下向性感染ではなく上向性感染により*M. bovis*の感染が広がったと考えられた。また、*M. bovirhinis*は健康な牛でも6～66%が鼻腔内に保菌していると報告されており、単独感染で明確な呼吸器症状を引き起こすことはない [10, 11]。今回認められた呼吸器症状にはMp以外の細菌感染の関与が疑われるが、鼻腔拭い液はMp検査のみしか行わなかったため原因は不明であった。

*M. bovis* 保菌牛のうち、牛Dが、2010年12月に初妊牛として導入され、2011年3月に分娩していた。発生農場では以前に今回のような難治性乳房炎の連続発生は

なく、牛D以外の保菌牛は1年以上前に導入されていることから、牛Dが*M. bovis*を不顕性に保菌したまま導入され、分娩後にMp性乳房炎を発症し、搾乳機器を介して感染を拡大させたと考えられた。過去に報告されているように [1-3, 8]、保菌牛の摘発、隔離を迅速に実施することが感染拡大を抑えるうえで重要である。

Mp保菌牛の治療は欧米では否定的 [2] であるが、国内では治療により治癒する個体もいることが報告されている [1, 8]。草場 [1] は、5日間以上のERFXの全身投与と塩酸OTC乳房注入剤の全乳房注入を推奨している。今回の薬剤感受性試験の結果、FP, TP, TMS, EM, OTC, TSの6剤のMIC値に比べ、ERFXとOBFXのMIC値は低かった (表2)。OTCのMIC値が過去の報告 [1, 2, 13, 14] よりも高かったこととMp性乳房炎罹患牛が高泌乳能力を有していたことから、ニューキノロン製剤による3～4日間の全身投与と乳房内注



入により治療を行った。ニューキノロン製剤の全身投与を行った4頭中3頭は治癒し、全身投与を行わなかった2頭中1頭もMpを検出しなくなった。今回は症例数も少なく治療方法も統一されていないため、治療効果の評価は難しいが一定の効果があったものと考えられた。しかし、今回示したERFXやOBFXのMIC値は低感受性の域であることから [2, 13-15], 感染拡大のリスクや抗生物質の慎重使用の観点から淘汰による早期の清浄化を目指すべきであったと思われる。

Mpは環境中でも長期間生存可能で [2, 7, 9], 一度感染した牛は間欠的に数カ月から数年も排菌するという報告 [2] があることから、長期的なモニタリングを実施した。その結果、牛Aは2011年8月にMp陰性であったが、9月と10月にふたたび*M. bovis*が検出され、11月に淘汰した。牛B, C, Dは8~10月に、牛Eは12~3月にMp陰性であったため治癒と判断した。牛Fは8月にMp陰性であったが乳汁の凝固物が消失しなかったため、9月に淘汰した。バルク乳は2011年8月から2012年10月までMp陰性を維持していた (表3)。清浄化対策以降、体細胞数は比較的強く推移した (図)。Mp性乳房炎の清浄化の判断は統一されていないが、牛群内の全頭が一斉にMp陰性となったときを清浄化と判断する報告 [1] がある。しかし、今回の報告では2011年8月に一旦*M. bovis*保菌牛全頭とバルク乳はMp陰性であったが、9月にふたたび牛Aから*M. bovis*が検出されていた。よって、一度全頭からMpが検出されなかったとしても油断することなく、継続して定期的なバルク乳のMp検査を実施し清浄化を目指す必要があると考えられた。

近年、バルク乳をPCR検査することでMp性乳房炎を発見する試みが報告されている [2, 12, 16-18]。今回、管内酪農家の牛の導入状況とMp性乳房炎浸潤状況を調べたところ、26戸すべてが外部より牛を導入しており、24戸が北海道からの導入であった。また、全戸のバルク乳でMpは検出されなかった。しかし、Mp性乳房炎の主要な侵入経路は症状の見られない保菌牛の導入であると報告されている [1, 3]。管内は自家育成を行う酪農家は少なく外部からの牛の導入が非常に多い地域のため、今後もMpの侵入を警戒する必要がある。Higuchiら [12] が指摘するように、Mp性乳房炎の侵入を監視するためにバルク乳を用いたPCR検査を定期的実施すべきと考える。

稿を終えるにあたり、助言と検査に協力いただいた酪農学園大学獣医学部獣医衛生学ユニットの樋口豪紀准教授に感謝する。

## 引用文献

[1] 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, 28, 12-15 (2010)

- [2] Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D, Rosenbusch RF, Step DL, Wilson DJ, Janzen ED : *Mycoplasma bovis* infections in cattle, J Vet Intern Med, 25, 772-783 (2011)
- [3] Nicholas RA : Bovine mycoplasmosis: silent and deadly, Vet Rec, 168, 459-462 (2011)
- [4] Chávez González YR, Ros Bascañana C, Bölske G, Mattsson JG, Fernández Molina C, Johansson KE : *In vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR, Vet Microbiol, 47, 183-190 (1995)
- [5] 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)
- [6] 小林寅吉：マイコプラズマ, 臨床と微生物, 36, 67-72 (2009)
- [7] Gonzalez RN, Wilson DJ : Mycoplasmal mastitis in dairy herds, Vet Clin North Am Food Anim Pract, 19, 199-221 (2003)
- [8] 安富一郎：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, 28, 20-24 (2010)
- [9] 樋口豪紀：マイコプラズマ性乳房炎の現状と課題, 動薬研究, 67, 12-19 (2011)
- [10] Angen O, Thomsen J, Larsen LE, Larsen J, Kokotovic B, Heegaard PM, Enemark JM : Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response, Vet Microbiol, 137, 165-171 (2009)
- [11] ter Laak EA, Noordergraaf JH, Boomsluiters E : The nasal mycoplasmal flora of healthy calves and cows, Zentralbl Veterinarmed B, 39, 610-616 (1992)
- [12] Higuchi H, Iwano H, Gondaira S, Kawai K, Nagahata H : Prevalence of *Mycoplasma* species in bulk tank milk in Japan, Vet Rec, 169, 442 (2011)
- [13] Soehnlen MK, Kunze ME, Karunathilake KE, Henwood BM, Kariyawasam S, Wolfgang DR, Jayarao BM : *In vitro* antimicrobial inhibition of *Mycoplasma bovis* isolates submitted to the Pennsylvania Animal Diagnostic Laboratory using flow cytometry and a broth microdilution method, J Vet Diagn Invest, 23, 547-551 (2011)
- [14] Uemura R, Sueyoshi M, Nagatomo H : Antimicrobial susceptibilities of four species of *Mycoplasma* isolated in 2008 and 2009 from cattle in Japan, J Vet Med Sci, 72, 1661-1663 (2010)
- [15] 小池新平, 宇佐美佳秀 : *Mycoplasma bovis* の薬剤感受性とマクロライド耐性株の23SリボゾームRNAドメインV領域の解析, 日獣会誌, 64, 45-49 (2011)
- [16] Arcangioli MA, Chazel M, Sellal E, Botrel MA, Bezille P, Poumarat F, Calavas D, Le Grand D : Prevalence of *Mycoplasma bovis* udder infection in dairy cattle: preliminary field investigation in south-east France, NZ Vet J, 59, 75-78 (2011)
- [17] Hirose K, Kawasaki Y, Kotani K, Tanaka A, Abiko K,

Ogawa H : Detection of mycoplasma in mastitic milk by PCR analysis and culture method, *J Vet Med Sci*, 63, 691-693 (2001)

Haesebrouck F, De Vliegher S : Between-herd prevalence of *Mycoplasma bovis* in bulk milk in Flanders, Belgium, *Res Vet Sci*, 92, 219-220 (2012)

[18] Passchyn P, Piepers S, De Meulemeester L, Boyen F,

---

Occurrence and Management of Bovine Mastitis Caused by *Mycoplasma bovis* at a Dairy Farm in Chiba Prefecture

Dai ISHIYAMA<sup>1)†</sup>, Hiroyasu SATOH<sup>1)</sup>, Nobuko INOUE<sup>1)</sup>, Akihiro OGAWA<sup>2)</sup>,  
Atsuko MATSUMOTO<sup>3)</sup> and Hideshige SHIMIZU<sup>1)</sup>

- 1) Sekiyado Branch Office, Seibu Veterinary Clinic, Chiba Prefectural Federated Agricultural Mutual Aid Association (P.F.A.M.A.A.), 462-11 Kirigasaku, Noda-shi, 270-0213, Japan
- 2) Chiba Office, Chuo Animal Health and Hygiene Service Center, 656 Sankaku-chou, Hanami-gawa-ku, Chiba-shi, 262-0011, Japan
- 3) Sakura Office, Chuo Animal Health and Hygiene Service Center, 497 Iwatomi-chou, Sakura-shi, 285-0072, Japan

SUMMARY

The occurrence of bovine mycoplasmal mastitis was observed for the first time at a dairy farm in Chiba Prefecture, Japan. Successive cases of refractory mastitis, which was not cured by antibiotics, occurred between May and June of 2012. *Mycoplasma bovis* was identified in mastitic milk of the diseased cows. Cows with mycoplasma mastitis manifested respiratory symptoms (4/5), udder edema (4/5), and multiple infected quarters (5/5). Bacteriological analysis of milk cultured on 5% sheep blood agar plates was negative for bacterial isolation (4/4). Mycoplasma survey of all milking cows revealed a prevalence rate of 12% (6/50). Six mycoplasma-positive cows were separated from other milking cows and treated with effective antibiotic therapy, and two of them were culled. Mycoplasmas were not seen in bulk milk monitoring after December 2011. A heifer suspected of subclinical infection with *M. bovis* is believed to have introduced and spread the infection to other cows after delivery. Therefore, in the areas where numerous cows are introduced from other areas, it is important to regularly conduct mycoplasma investigations of bulk milk.

—Key words : bovine mycoplasmal mastitis, eradication program, *Mycoplasma bovis*.

† Correspondence to : Dai ISHIYAMA (Sekiyado Branch Office, Seibu Veterinary Clinic, Chiba Prefectural Federated Agricultural Mutual Aid Association (P.F.A.M.A.A.))

462-11 Kirigasaku, Noda-shi, 270-0213, Japan

TEL 04-7196-0005 FAX 04-7196-0146 E-mail : daimode@gmail.com

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 67, 188 ~ 192 (2014)