

乳汁からの抗酸菌分離と乳房炎の関連

○中島博美、小松浩、小室徳宏
(伊那家畜保健衛生所)

要約

管内のヨーネ病発生 A 農場で、ヨーネ病患者の乳汁および農場の敷料から抗酸菌 (*Mycobacterium thermoresistibile* (M.t)) が分離された。当該農場は、乳房炎も多発しており乳質向上の観点から抗酸菌との関連を検討した。A 農場において、乾乳牛および乳房炎牛の乳汁から抗酸菌の分離検査と、24 ヶ月齢以上の死亡牛の乳腺組織等から抗酸菌の分離検査および病理組織学検査を実施した。結果、延べ 114 頭の乳汁から 35 頭(30.7%)で抗酸菌 (M.t, *M.hassiacum* (M.h), *M.chitae* (M.ch)) が分離された。病理組織学検査では、多核巨細胞や類上皮細胞の浸潤による肉芽腫が確認された。また、管内 49 農場のバルク乳と、管内の 2 農場 (B および C 農場) の個体乳汁から抗酸菌の分離検査を実施した。結果、バルク乳では、3/49 農場 (6%) から抗酸菌を分離した。個体乳汁では、B 農場において乳房炎由来乳汁 11/12 頭 (91.7%) で M.t、C 農場においては搾乳牛由来乳汁 1/20 頭 (5%) で M.ch が分離された。今回、特定の農場の乳汁から高率に抗酸菌が分離され、乳房炎との関連が示唆されたが、今後さらなる検討が必要と思われた。

材料

はじめに

乳房炎由来の乳汁において、一般的な細菌検査を実施して細菌が分離されない症例が 20%程度あるといわれている¹⁾。抗酸菌は、マイコプラズマと同じように一般的な細菌検査では分離されない。

また、ヨーネ病検査におけるエライザ検査で非特異反応に抗酸菌が関与しているとの報告もある²⁾。

今回、管内のヨーネ病が多発した農場において、ヨーネ病患者の乳汁と農場の敷料から抗酸菌が分離されたことと、当該農場では乳房炎が多発していたことから抗酸菌と乳房炎の関連について検討した。

バルク乳:平成 24 年 6 月に管内 49 農場(49 検体)で採材

個体乳: 3 農場 (A・B・C) (表 1)

①A 農場: 検体は、分娩前 2 週間を目安とした乾乳牛の分房乳 37 頭 128 検体と、乳房炎などを含む搾乳牛の乳汁 77 頭 77 検体、計 114 頭 205 検体を用いた。

②B 農場: 検体は、乳房炎を呈した乳汁 12 頭 15 検体(分房乳および合乳)を用いた。

③C 農場: 搾乳牛の乳汁 20 頭 20 検体を用いた。

死亡牛:平成 23 年 12 月から平成 24 年 12 月までの 1 年間、A 農場で死亡した 24 ヶ月齢以上の牛 12 頭中 9 頭の乳汁、乳腺組織、乳房リンパ節などを用いた。

(表1) 3農場の概要

農場	ヨーネ病発生状況	バルク乳由来 抗酸菌分離	飼養形態	敷料
A	発生	有 (M.t)	フリーバーン	戻し堆肥
B	発生	有 (M.t)	フリーバーン	オガ屑
C	非発生	無	フリーバーン	オガ屑

A及びB農場のヨーネ病発生状況など

A農場：搾乳牛約110頭、戻し堆肥を用いたフリーバーンで飼養している。平成18年以降37頭のヨーネ病患者を摘発した(菌分離は2頭のみ)。平成23年以降の発生はみられていない。敷料やヨーネ病患者の乳汁からM.tが分離されている。また、乳房炎の発生が多い農場である。

B農場：搾乳牛約80頭、オガ屑を用いたフリーバーンで飼養している。平成18年に3頭のヨーネ病患者を摘発した。以降の発生はみられていない。ヨーネ菌の分離はなかった。

検査方法

乳汁検査

①抗酸菌分離検査：アルカリ処理(4%NaOH)後、2%小川PS培地「ニスイ」へ0.1ml接種し、37℃好気培養した(観察は1か月まで)。

②一般細菌検査：常法のとおり実施した。

死亡牛検査

①抗酸菌分離検査：乳汁検査と同様に実施した。

②病理組織学検査：常法によりパラフィン包埋切片を作成後、ヘマトキシリン・エオジン染色、グラム染色及びチール・ネルゼン染色を施し鏡検した。

抗酸菌の同定

小川培地上のコロニーをクローニングし、抗酸菌染色後、InstaGeneMatrix (BIO-RAD)を用いてDNAを抽出し、制限酵素(BstE II、Hae III)を用いたhsp65PCR-RFLPの切断パターンによる菌種の検索、また16SrRNAの遺伝子解析により99%以上の相同性を示した菌種を同定とした。なお、遺伝子解析は、hsp65PCR-RFLPで同一菌種であった場合は実施しなかった。

検査結果

今回分離された抗酸菌(Mycobacterium属菌)は、*M.thermoresistibile* (M.t)、*M.hassiacum* (M.h)、*M.chitae* (M.ch)の3菌種であった。これらは、非結核性抗酸菌に分類され、土壌や河川水、海水などの自然界に広く分布している⁴⁾。

また、このM.tとM.hはヨーネ病検査におけるエライザ検査の非特異反応の原因菌種として報告がある²⁾³⁾。

バルク乳からの抗酸菌分離 (表2)

49農場中3農場(6%)で抗酸菌が分離された。

表2バルク乳から抗酸菌が分離された3農場

農場名	分離菌種	飼養形態	敷料	ヨーネ病発生歴
A	M.t	フリーバーン	戻し堆肥	有
B	M.t	フリーバーン	オガ屑	有
D	M属菌*	タイストル	なし	無

*：M.t、M.h、M.ch以外のMycobacterium属菌

個体乳汁からの抗酸菌分離 (表3)

バルク乳からM.tが分離されたA農場で

は、乾乳や搾乳牛の乳汁 114 頭中 35 頭 (30.7%) で抗酸菌 (Mt, M.h, M.ch) が分離された。

同様にバルク乳から M.t が分離された B 農場では、乳房炎を呈した乳汁 12 頭中 11 頭 (91.7%) で抗酸菌 (M.t のみ) が分離された。

バルク乳から抗酸菌の分離がなかった C 農場では、搾乳牛 20 頭中 1 頭 (5%) で抗酸菌 (M.ch) が分離された。

表3 個体乳汁からの抗酸菌分離

・ 検査対象:3農場				
農場名	バルク由来抗酸菌*	抗酸菌分離状況(菌種)	検体	備考
A	M.t	35/114 頭 (30.7%) M.t,M.h,M.ch	乾乳・搾乳牛乳汁 114頭205検体 (分房・合乳)	死亡牛 検査実施
B	M.t	11/12 頭 (91.7%) M.t	乳房炎乳汁 12頭15検体 (分房・合乳)	
C	陰性	1/20 頭 (5%) M.ch	搾乳牛乳汁 20頭20検体 (合乳)	オガ屑、FB、 ヨーネ病発生 歴なし

① A 農場の結果詳細 (表4)

A 農場では、乾乳牛 37 頭中 22 頭(59.5%) から抗酸菌が分離された。分離菌種は、M.t、M.h、M.ch の 3 菌種であった。搾乳牛は 77 頭中 13 頭 (16.9%) から抗酸菌が分離された。分離菌種は、M.t と M 属菌であった。搾乳牛より乾乳牛の方が抗酸菌の分離率が高かった。

② B 農場の結果詳細 (表5)

12 頭(15 検体)の乳房炎を呈した牛の乳汁を用い、抗酸菌と一般細菌の分離検査を実施したところ、11 頭 (13 検体) (91.7% (検体では 86.7%)) から M.t が分離された。

そのうち、一般細菌が分離されずに M.t のみが分離された牛は、8 頭 (9 検体) (66.67%(検体では 60.0%)) だった。

また、牛 No.⑩のように同一個体でも分房により分離成績は異なっていた。

表4 A 農場における乳汁中抗酸菌分離状況

区分	検体	検体数 (実頭数)	抗酸菌 分離数	抗酸菌 分離率	分離 菌種*
乾乳	分房乳	37頭 (37)	22頭	59.5 %	M.t(25) M.h(3) M.ch(3)
	分房	128検体	31検体	24.2 %	
搾乳	合乳	77頭 (61)	13頭 (12)	16.9 %	M.t(12) M属菌(1)**
合計		114頭 (90)	35頭 (32)	30.7 %	
		205検体	44検体	21.5 %	

*: ()内は検体数
**: 現在測定中

表5 B 農場での乳房炎乳汁からの抗酸菌分離状況

検体No.	牛	抗酸菌 菌種	抗酸菌 コロニ数	SCC 千/ml	生菌数 cfu/ml	一般細菌 分離菌種	分離部位
1	①	M.t	3		47	0	左後
2	②	M.t	1		18	0	右後
3	③	M.t	1	3,748	0		両後
4	④		0		43	0	右後・左前後
5	⑤	M.t	8	122	1,200	CNS、OS	4分房合乳
6	⑥	M.t	1	52	400	CNS	右前・左前後
7	⑦	M.t	2	4,085	0		右前後
8	⑧	M.t	16	178	0		4分房合乳
9	⑨	M.t	1	58	0		左後
10	⑩	M.t	21	1,203	0		4分房合乳
11	⑪	M.t	38	130	2,800	EC+	右前
12		M.t	1		16	0	右後
13		M.t	48	582	0		左前
14			0	2,848	0		左後
15	⑫	M.t	1	1,464	1,000	CNS	右前後・左後

*EC:大腸菌

死亡牛の検査 (表6)

検査を実施した 9 頭のうち、3 頭の乳汁や乳房リンパ節から抗酸菌 (M.t, M.ch) が分離され、それらの牛の乳腺組織や乳房リンパ節で多核巨細胞や類上皮細胞の浸潤による肉芽腫の形成が確認された。

また、2 頭では、乳汁や乳房リンパ節から抗酸菌は分離されたが、病理所見で著変はみられなかった。

さらに、4 頭では、乳汁やリンパ節からの抗酸菌分離はされず、病理所見で著変もみられなかった。

なお、全ての検体でチール・ネルゼン染色は陰性であった。

表6 A農場の死亡牛検査成績

No.	細菌検査		病理検査		チール・ネルゼン染色	値差 乳汁一般細菌
	乳汁抗酸菌	リンパ節抗酸菌	乳腺	乳房リンパ節		
1	M.t	陰性	肉芽腫形成	化膿性病変	-	Strep
2	M.t	M.t	肉芽腫形成	肉芽腫形成	-	Cory
3	M.t, M.ch	陰性	肉芽腫形成	化膿性病変	-	OS
4	M.t	陰性	著変なし	著変なし	-	NT
5	M.t	陰性	著変なし	著変なし	-	Cory
6	陰性	陰性	著変なし	著変なし	-	CNS
7	陰性	陰性	著変なし	著変なし	-	NT
8	陰性	陰性	化膿性病変	著変なし	-	OS, Apy
9	陰性	陰性	著変なし	化膿性病変	-	NT

*NT:検査未実施、CNS:コアグラゼ陰性ブドウ球菌、OS:レンサ球菌
Cory:コリネバクテリウム属菌、Apy:アルカバクテリウム・ヒオゲネス

死亡牛 No.2 (抗酸菌の分離と肉芽腫形成の見られた牛) の病理所見は、左乳房の外貌に腫脹が見られ、断面では暗赤色を呈し硬結が確認された。ホルマリン固定後では巢状性に充出血が散見された (図1)。乳腺の弱拡大では多核巨細胞や類上皮細胞の浸潤による肉芽腫形成が比較的多く確認された。(図2 対照として死亡牛 No.7 のほぼ正常と思われる乳腺組織を併載)。乳腺の肉芽腫が確認された同部位におけるグラム染色では、グラム陽性桿菌が確認されたが、チール・ネルゼン染色は陰性であった(図3)。肉芽腫形成のみられなかった部位では、好中球やリンパ球が浸潤した化膿性病変がみられた (図4)。乳房リンパ節において、まれに肉芽腫形成が確認されたが、グラム染色で菌体は確認できず、チール・ネルゼン染色では陰性であった (図5)。

考察

乳房炎乳汁の細菌検査で「菌分離陰性」と判定される症例は多い。近年、乳房炎起因菌の中でも注目されているマイコプラズマと同じように抗酸菌も通常の細菌検査では分離ができない。

今回、ヨーネ病が多発した A 農場で敷料やヨーネ病患者の乳汁から M.t が分離され

たこと、当該農場では乳房炎も多発していたことなどから、乳房炎と抗酸菌の関連を検討した。

管内49農場のバルク乳で3農場から抗酸菌が分離され、M.t が2農場で分離された。1つは、ヨーネ病多発の A 農場であり、もう1つの B 農場も A 農場の初発と同時期にヨーネ病の発生があった。両農場とも飼養形態はフリーバーンであった。この M.t はヨーネ病のエライザ検査において非特異反応を起こす可能性のある菌種として報告がある^{2),3)}。A 農場におけるヨーネ病の発生は、摘発された 37 頭中、菌分離された牛が 2 頭いたが、発生状況などからその多くは非特異反応による事例と推察される。なお、B 農場では 3 頭の摘発であったが、ヨーネ菌の分離はなかった。

A 農場の個体乳汁由来の抗酸菌分離成績については、延べ 114 頭中 35 頭 (30.7%) で抗酸菌が分離された。その内訳は、乾乳牛で 37 頭中 22 頭 (59.5%) から、搾乳牛では、77 頭中 13 頭 (16.9%) からであった。搾乳牛に比べて乾乳牛で高率に抗酸菌が分離されることについては、「搾乳」という日々の乳汁の排出のない乾乳牛では、乳房内に一度侵入した抗酸菌がそのまま乳房内に留まるためと推察された。このことは、農場での抗酸菌の浸潤状況を調査する際には検査対象を乾乳牛にすると効率よく保菌牛を摘発できるものと考えられた。

分離菌種については、M.t が 37 頭、M.h が 3 頭、M.ch が 3 頭であり、8 割以上が M.t であった。A 農場でヨーネ病発生時に環境中から分離された抗酸菌は M.t であったが、抗酸菌は環境中に常在しているため M.h や M.ch もその比率は少なくとも A 農

場の敷料には常在していると考えられた。また、乾乳牛など乳房炎の症状が見られない牛からも抗酸菌は分離されていることから抗酸菌は日和見感染菌と思われた。

また、矢部らは、*M.t* や *M.h* は 60 度の加温では菌が生育し、特に *M.t* を死滅するためには 70 度 60 分以上の加温が必要で、冬期に発酵温度が 70 度を下回る場合は、堆肥発酵熱では死滅しないと報告している²⁾。A 農場では、戻し堆肥を敷料として使用しており、特に冬季には、発酵温度が 70 度を下回る可能性が高く、*M.t* や *M.h* が常に敷料中に混在した状態であったと推察された。

A 農場は、乳房炎対策の一つとして 1 年数か月前より牛床への石灰散布を 1 日 1 回開始した。小沼らは、抗酸菌の消毒方法として消石灰は感作 1 日後から効果が確認できたと報告している⁵⁾。石灰散布が *M.t* や *M.h* に直接的に効果があったかは不明であるが、A 農場では乳房炎は減少している。

B 農場の個体乳汁由来の抗酸菌分離成績については、乳房炎を呈した 12 頭 15 検体中 11 頭 13 検体 (91.7% (検体として 86.7%)) で分離され、その菌種は全て *M.t* であった。また、B 農場においては、抗酸菌の分離検査と同時に一般細菌検査も実施しており、一般細菌が分離されず *M.t* のみが分離は、8 頭 9 検体 (66.7% (検体として 60%)) であった。

抗酸菌による乳房炎は、海外においては *M.chelonae* や *M.smegmatis* による事例、国内では矢部らの *M.t* による事例の報告はあるが、その数は少ない。B 農場においては、乳房炎を呈しており、矢部らの報告と同様に *M.t* のみ分離された牛は、*M.t* によ

る乳房炎と推察された。なお、B 農場へは、敷料に用いるオガ屑に消石灰を混ぜてから散布することを提案した。

A 農場において、病理組織検査を実施した 9 頭中 3 頭で抗酸菌の分離と病理組織検査で多核巨細胞や類上皮細胞の浸潤による肉芽腫の形成が確認された。肉芽腫の形成は炎症性反応の一つであり、この所見のみで抗酸菌の関与を決定付けるものではない。また、すべての検体でチール・ネルゼン染色は陰性であった。しかし、菌量や菌体の染色性などによっては陰性になることもある。分離状況などから *M.t* が乳房炎に関与していると示唆されるが、今後のさらなる検討が必要と思われた。

謝辞

なお、本稿は、佐久および松本家畜保健衛生所との共同調査・研究であり多大なる御協力をいただきましたことに深謝致します。

参考文献

- 1) 塚田康祐：家畜診療、411、29-32 (1997)
- 2) 矢部静ら：臨床獣医、Vol.30、No.6、41-47 (2012)
- 3) 農林水産省・安全局長：23 消安第 5105 号、平成 24 年 2 月 1 日
- 4) 森田幸雄ら：エタンメディア、52 巻、3 号 (2006)
- 5) 小沼成尚：平成 20 年度全国家畜保健衛生業績抄録

乳汁からの抗酸菌分離と乳房炎の関連

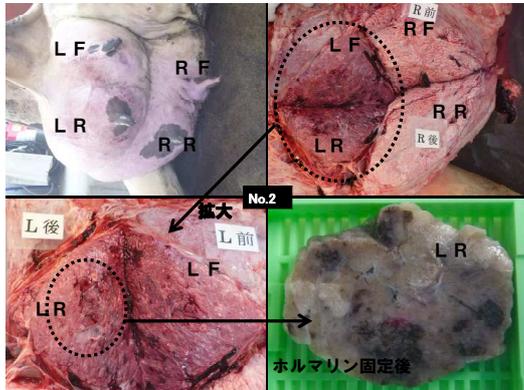


図1 死亡牛 No.2 乳腺の外貌と剖面

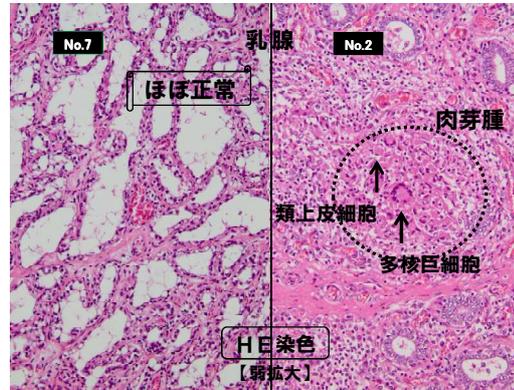


図2 乳腺 肉芽腫形成

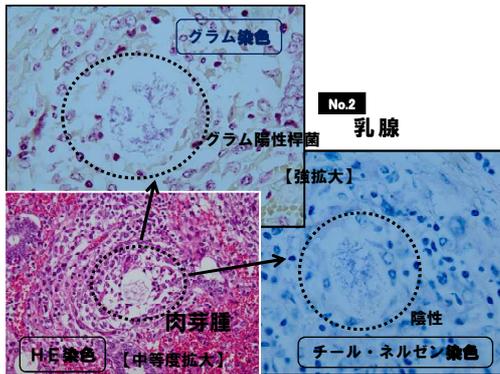


図3 乳腺の肉芽腫における各染色

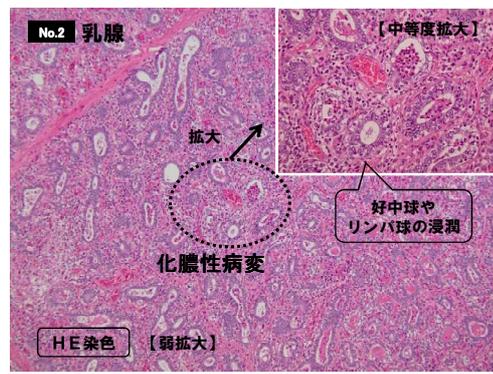


図4 乳腺の化膿性病変

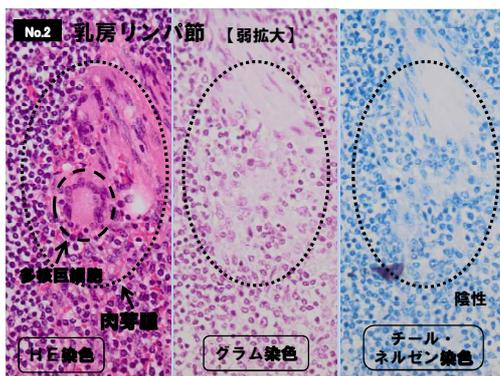


図5 乳房リンパ節の肉芽腫における各染色