

# 血清抗体価を用いた牛マイコプラズマ性乳房炎の清浄化と

## 環境検査による再発防止対策

○中村 光、佐藤 聖子、中山 恵、青木 一郎、林 健  
(長野県伊那家畜保健衛生所)

### はじめに

近年、日本の大規模農場を中心としてマイコプラズマ感染症の発生が増加しており、規模拡大のために積極的な導入を行っている農場ほど外部からマイコプラズマが侵入しやすく、大規模牛群における発生増加と関連している可能性がある[1]。農場で問題になりやすい牛マイコプラズマ感染症として、*Mycoplasma bovis* (以下、*M.bovis*)、*Mycoplasma californicum*、*Mycoplasma bovigenitalium* (以下、*M.bg*)等を原因菌とした乳房炎、肺炎、関節炎、中耳炎があり、特に *M.bovis* による牛マイコプラズマ性乳房炎は、一度罹患すると保菌牛として生涯排菌する問題がある。これは、*M.bovis* が可変表面タンパク(Vsps)を持ち、誘導された抗体に対し表面タンパク質が遺伝的な組み換えを行うことで、液性免疫を逃れ、細胞内に侵入するためである。宿主細胞内で長期間生存する *M.bovis* は、乳腺細胞へ感染し難治性乳房炎を引き起こすだけでなく、リンパ管や血管を介して呼吸器や生殖器に感染する。また、*M.bovis* は、牛呼吸器病候群 (BRDC) の主な病原体の一つとされ、他の呼吸器症状を引き起こす細菌の感染を促す素因となる可能性が示唆されている。マイコプラズマの細菌培養検査は、採材から同定まで1週間以上を要するため、発生農場における初期対応の遅れに繋がることで、深刻な経済的損失を招く恐れがある[2][3][4][5][6]。

本例では、管内の *M.bovis* が摘発された大規模農場で清浄化に向けて継続的に

行った対策と子牛の環境検査による再発防止対策について報告する。

### 農場概要

当該農場は、2021年から規模拡大のため導入を続けており、2022年12月の搾乳頭数が約450頭になった。また、2021年から2022年にかけて、パラレルパーラーからロータリーパーラーへの変更、大型バルクタンクの設置、フリーバーン牛舎の増築がなされた(図1)。

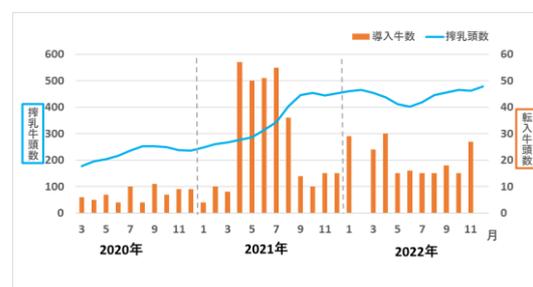


図1 搾乳牛および導入牛の頭数変化

### 経過

2021年6月、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としたバルク乳スクリーニング検査を実施したところ当該農場のバルクタンクから *M.bovis* が分離された。そこで2021年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。2021年11月に清浄性確認のため、2回目の搾乳牛全頭検査(447頭)を行い、新たに *M.bovis* 陽性牛を27頭摘発した。

2022年5月、10月に実施したバルク乳スクリーニング検査及び搾乳牛全頭検査（5月：406頭、10月465頭）では、*M.bovis* 陽性牛が確認されなかった。しかし、5月に *M.bg* 陽性牛2頭を摘発した。また2022年3月、中耳炎を発症した子牛1頭の鼻汁から *Mycoplasma bovirhinis*（以下、*M.brh*）が分離された。

乾乳牛及び導入牛については、2021年7月の摘発時から継続的に分娩後検査を行い、2022年12月までに571頭中4頭の *M.bovis* 陽性牛および1頭の *M.bg* 陽性牛を摘発した[7]。

2022年12月以降、当該農場において *M.bovis* 陽性牛は、確認されなかった。しかし、継続的な導入が続いており、新たな *M.bovis* 感染牛の侵入により、再び農場にまん延してしまう可能性があった。さらに、マイコプラズマ感染が疑われる中耳炎による子牛の耳垂れが散発して確認された。上記の問題に対して、農場における *M.bovis* まん延状況の確認および乾乳牛における *M.bovis* 感染牛の早期摘発のため、血清を用いた乾乳牛の抗体検査を行った。また、子牛間のマイコプラズマ感染症流行防止のため子牛の給与乳および飼育環境の細菌検査を実施し、検査結果を踏まえた衛生指導を行った。

### *M.bovis* 陽性牛および陰性牛の抗体量調査

#### 材料及び方法

2021年7月の全頭搾乳牛検査で摘発された *M.bovis* 陽性牛21頭及び *M.bovis* 陰性牛5頭の血清計26検体を用い、P81 ELISAにて、*M.bovis* 抗体量調査を行った。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る。カットオフ値は、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  であり、カットオフ値以上を抗体陽性と同定した。また、

検出上限は、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  である。t検定を行い有意水準5%以下（ $p < 0.05$ ）を有意とした[8][9]。

#### 結果

*M.bovis* 陽性牛の抗体量は、検出上限の200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を示す個体が21頭中8頭確認され、*M.bovis* 陰性牛よりも優位（ $p < 0.05$ ）に高値を示した（図2）。

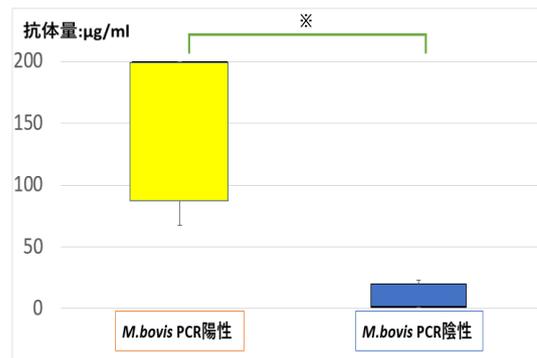


図2 *M.bovis* 陽性牛と陰性牛の抗体量調査（※  $p < 0.05$ ）

### 乾乳牛の抗体量調査

#### 材料及び方法

2021年8月に当該農場で採材した乾乳牛111頭の血清を用いて、P81 ELISAで、*M.bovis* 抗体量調査を行った。

#### 結果

乾乳牛では、76頭が抗体陰性であり抗体陽性は、35頭であった。そのうち検出上限である200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の抗体量を示す個体が7頭確認された（図3）。

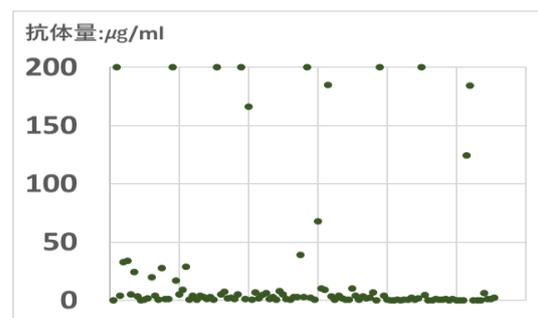


図3 乾乳牛の *M.bovis* 抗体量

## 乾乳牛群における抗体陰性率の推移

### 材料及び方法

2021年8月、11月、2022年2月、4月の計4回、P81 ELISAによる乾乳牛群の抗体量調査を行った。

### 結果

2021年8月、11月の乾乳牛群の抗体陰性率は、それぞれ69%、67%であった。対して、農場内の *M.bovis* 陽性牛を全て淘汰するなどの対策を実施した2022年2月、4月の抗体陰性率は、それぞれ89%、83%になり、抗体陰性率が上昇した(図4)。

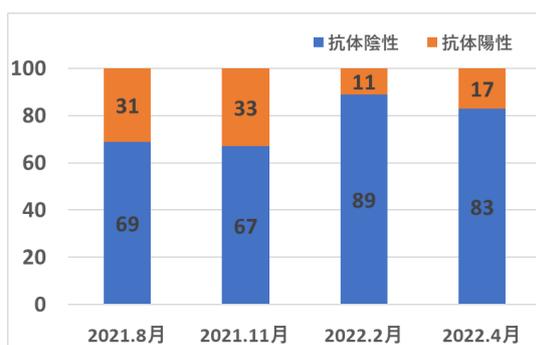


図4 乾乳牛群の抗体陰性率

## 抗体量調査を利用した慢性乳房炎牛への応用

### 材料及び方法

*M.bovis* は、潜伏感染をすることで、検査から逃れることや生体内に長期生存することが知られている[2][10][11]。そこで、当該農場における *M.bovis* 潜伏感染牛の早期摘発のため、*M.bovis* 未分離かつ慢性的に乳房炎を繰り返していた搾乳牛(慢性乳房炎牛)10頭の血清を用いて抗体量調査を行った。

### 結果

当該農場における慢性乳房炎牛10頭の内、5頭が抗体陽性を示した。(表

1)。

表1 慢性乳房炎牛の *M.bovis* 抗体量

血清No	<i>M.bovis</i> 抗体量 (μg/ml)
1	4.7
2	0.8
3	0.9
4	0.5
5	34.8
6	169.0
7	10.6
8	85.1
9	104.0
10	4.7

※カットオフ値：5 μg/ml

## 子牛におけるマイコプラズマ感染症の流行防止対策

### 背景、材料及び方法

*M.bovis* の清浄化対策を進める中、当該農場では、中耳炎を発症する子牛が多く、円滑な預託や販売に支障が出ていた(図5)。子牛の中耳炎は、牛マイコプラズマ感染症の特徴的な症状の1つである[12][13]。そこで、当該農場の子牛間で流行している中耳炎の原因菌特定のため、典型的な耳垂れを引き起こしている子牛の鼻汁を用いてマイコプラズマ培養検査を行った。また、子牛間のマイコプラズマ感染症流行防止のため、従業員へ子牛の飼育状況の聞き取り及び、表2に示した給与乳ルート各段階での環境拭き取り、給与乳の一般細菌検査およびマイコプラズマ培養検査を実施した。

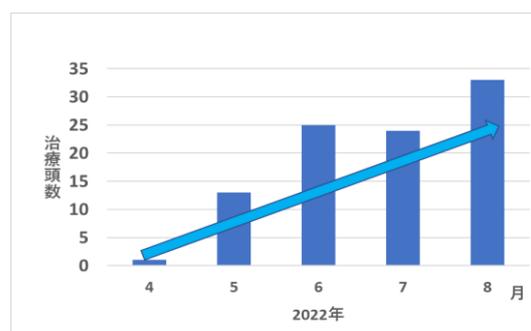


図5 中耳炎の子牛頭数

表2 子牛給与乳ルート各段階

①乳房炎牛のバケツミルカー（ミルククロー内部）
②パスチャライズ前タンクおよびパスチャライズ前給与乳
③移動式パスチャライザー（以下ミルクタクシー）およびパスチャライズ後給与乳
④哺乳バケツ
⑤子牛用バルクタンク

結果

鼻汁のマイコプラズマ培養検査では、1頭中1頭で *M.brh* が分離された。

従業員への聞き取り調査の結果、農場では、経費削減のため子牛への給与乳に廃棄乳（治療中の乳房炎牛の乳）をパスチャライズして使用していること、外国人を含む従業員数が多く、子牛牛舎の作業担当者が日によって交代している背景があった。

一般細菌は、複数の採材場所で総菌数、細菌種が共に多く確認された（総菌数 >20,000CFU/ml）。また、採材時にバケツミルカーのミルククロー内部や哺乳バケツのニップル接合部で、洗浄不足による多くの乳石と乾燥不足が確認された（表3）。また環境拭き取り、給与乳からマイコプラズマは、分離されなかった。

表3 子牛の飼育環境検査結果

採材箇所	検体	総菌数 (CFU/ml)	備考
①バケツミルカーのミルククロー内部	拭き取り	3,400	採材時に多くの乳石を確認
②パスチャライズ前タンク	拭き取り 乳汁	>20,000 >20,000	
③ミルクタクシー	拭き取り 乳汁	>20,000 >20,000	
④哺乳バケツ	拭き取り	>20,000	ニップル接合部に乳石を確認 乾燥不足を確認
⑤子牛用バルクタンク	拭き取り 乳	>20,000 >20,000	



子牛の飼育環境に対する衛生指導および指導後の環境検査

衛生指導の内容

農場への聞き取り調査と環境検査の結果

を踏まえ、以下4つの改善点を指摘した。  
①哺乳バケツの余った乳をミルクタクシーに戻っていたことから、哺乳バケツの乳をパスチャライズ後の乳と混ぜないこと、②哺乳バケツ等、給与機器や器具の洗浄や乾燥を徹底すること、③複数台のミルクタクシーを効率的に活用すること、④ミルククロー内部の乳石を除去する頻度を高めること。そして子牛飼育の責任者がおらず、作業手順が作業者によって異なっていたため、子牛の飼育責任者を決め、作業手順を再確認すること。

これらに対し、写真を多く用いた対策案を作成し、外国人労働者を含む従業員にわかりやすく説明すると共に、給与から機器の洗浄までの作業方法の統一化を図った（図6）。

指導後の環境検査

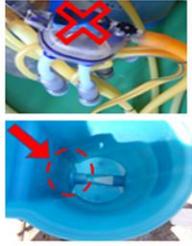
衛生指導を行った3か月後に、再度同じ採材箇所の環境検査を行った。

図6 対策案の一例

場所別対策案

**問題箇所：バケツ、哺乳バケツ**

- バケツのティートカップ内側からの細菌は、未検出でしたが、ミルククロー部分に乳石が多く、多数の菌が検出されました。
- 哺乳バケツのニップル結合部等、洗いづらい箇所が目で見えるほど汚れていました。

**対策案①：**

- 定期的なミルククロー部分（ゴム部分）の点検を含む、手動洗浄。
- 哺乳バケツ洗浄の際に、汚れやすい部分（ニップルの結合部）を集中洗浄。

**対策案②：**

- 哺乳バケツ、ニップルの乾燥不十分は、細菌の温床につながるため哺乳バケツ、ニップルの数を多くして半分は、乾燥し交互に使用。バケツとニップルの乾燥場所をつくる。
- 担当者ごと手技に変化がないように洗い方のリスト化

結果

前回と同様に多くの細菌が分離された場所は、バケツミルカーのミルククロー内部の拭き取り、パスチャライズ前タンク内の乳汁、ミルクタクシー内の乳汁、子牛用

バルクタンク内の乳汁であり、パステライズ前後で確認された総菌数に変化がなかった。しかし、哺乳バケツを含む4か所の拭き取り検体から分離された細菌数は、非常に少なく、洗浄・消毒・乾燥の改善効果が見られた(表4)。

さらに前回、同定された細菌種と比較すると衛生指導後、3か所の拭き取り検体から分離された細菌種が減少した(表5)。2回の環境検査を踏まえ、以下の2点を指導した。①搾乳衛生を徹底することで、子牛の給与乳における細菌数の減少させること、②細菌感染への抵抗力をつけるために子牛牛舎の飼育環境の改善を行うこと。

衛生指導の結果、8月以降の中耳炎および呼吸器症状で治療した子牛の頭数は、減少した(図7)。

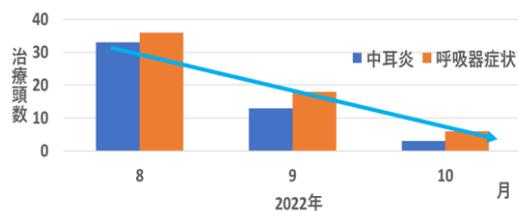


図7 中耳炎および呼吸器症状の子牛頭数

## 考察

当該農場では、2021年に実施したバルク乳スクリーニング検査で *M.bovis* が確認され、継続的なマイコプラズマ清浄化対策を行い、合計で *M.bovis* 陽性牛61頭、*M.bg* 陽性牛3頭を摘発した。2021年から2022年にかけて、規模拡大のために継続的な導入をしていた背景があり、マイコプラズマが新規導入牛と共に農場へ侵入したことが強く示唆された[14]。

*M.bovis* および *M.bg* 陽性牛を摘発・淘汰を行った後も、継続的な導入が続いており、新たなマイコプラズマ感染牛が農場に侵入し、まん延する可能性があった。

上記の課題に対し、*M.bovis* 潜伏感染牛を早期に摘発し、農場内のまん延を防止するために、P81ELISAを用いた抗体検査を活用した。農場における *M.bovis* のまん延が疑われた2021年の乾乳牛群における *M.bovis* 抗体陰性率は、6割であったが、清浄化対策が進み、2022年には、抗体陰性率が8割に上昇したことが確認された。また、培養検査で *M.bovis* が非検出かつ慢性的に乳房炎を繰り返す個体に対して、抗体検査を行うことで血清学的視点から *M.bovis* 潜伏感染牛を早期に摘発した。抗体検査は、マイコプラズマ培養検査によって検出できない個体に対する *M.bovis* 感染の有無を知る一手になり得た。

従来 of 乳汁を用いた培養検査では、迅速に潜伏感染牛の摘発を行うことが難し

表4 衛生指導後の飼育環境検査結果(総菌数)

採材箇所	検体	前回の総菌数 (CFU/ml)	今回の総菌数 (CFU/ml)
①バケツミルクの内部	拭き取り	3,400	>20,000
	乳汁	>20,000	>20,000
②パステライズ前タンク	拭き取り	>20,000	640
	乳汁	>20,000	>20,000
③ミルクタクシー	拭き取り	>20,000	640
	乳汁	>20,000	>20,000
④哺乳バケツ	拭き取り	>20,000	240
⑤子牛用バルクタンク	拭き取り	>20,000	80
	乳汁	>20,000	>20,000

表5 衛生指導後の飼育環境検査結果(細菌種)

採材箇所	前回の細菌種	今回の細菌種
パステライズ後の給与乳	大腸菌、ブドウ球菌、連鎖球菌、耐熱性菌	ブドウ球菌、耐熱性菌
子牛用バルクタンクの内部壁面	大腸菌、ブドウ球菌、連鎖球菌、耐熱性菌	ブドウ球菌
哺乳バケツの内部壁面	大腸菌、ブドウ球菌、連鎖球菌	ブドウ球菌、耐熱性菌

い。また、*M.bovis* 清浄化の指標が、発生農場において複数回のバルク乳検査または、全頭個体乳検査を行い、*M.bovis* が確認されないことで清浄化とする細菌学的な視点のみであったが、当該農場では、抗体検査を従来の培養検査と組み合わせることで、搾乳牛だけでなく、乾乳牛群における潜伏感染牛の早期摘発や再発症の可能性がある抗体陽性牛の早期廃用や隔離治療の指標として、血清学的な視点からも農場の清浄化を確認できた[2][10]。

また、マイコプラズマ感染が疑われる中耳炎の特徴である子牛の耳垂れが散発して確認されていたため、子牛の飼育環境について細菌検査を行い、結果を踏まえた衛生指導により、中耳炎だけでなく、鼻汁や発咳などの呼吸器症状を示す個体を減少させることができた。環境検査を踏まえた衛生指導は、マイコプラズマ感染症の子牛間流行を防止するだけでなく、BRDCの対策としても有効であったと考えられた[4][15]。

農場のマイコプラズマ清浄性の維持には、分娩後検査と抗体検査を併用した導入牛への検査には、本手法が有効であったと考えるが、P81ELISAによる抗体検査は、研究段階であり、現場で実用化されていないことから市販化が望まれる。加えて、子牛の検査及び牛舎等の環境検査も同時に行うことが、牛マイコプラズマ性乳房炎の原因菌である *M.bovis* を農場から排除するためには、重要である。

最後に本調査を実施する上でご協力いただいた樋口豪紀教授、権平智講師及び酪農学園大学獣医衛生学ユニットに深謝する。

#### 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, 2010, 6）  
[2]家畜衛生対策推進協議会：牛マイコプラズマ乳房炎の防除技術

[3]湯澤ら：管内大規模酪農家における牛マイコプラズマ乳房炎の防除指導（栃木県家畜保健衛生業績発表会集録 55 1-4, 2013）

[4]Zoetis:BRDC 対策 2.0

(<https://www.zoetis.jp/ls/cattle/brdc/pathogen/mycoplasmabovis/>)

[5]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）

[6]樋口豪紀：マイコプラズマ性乳房炎の特徴とその検査技術（MP アグロジャーナル 2010. 10）

[7]中村ら：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

(<https://www.pref.nagano.lg.jp/inakachiku/chosa/chosa.html>)

[8]高橋ら：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）

[9]湯本ら：牛マイコプラズマ感染症発症群における血清抗体価の経時的変化（家畜衛生学雑誌 第48巻第48号, 2022）

[10]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>）

[11]樋口：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（臨床症状獣医 2021. 10）

[12]愛知県西部家畜保健衛生所：子牛にこのような症状はありませんか？

(<https://www.pref.aichi.jp/uploaded/attachment/46357.pdf>)

[13]樋口ら：呼吸器疾患の臨床微生物学6:マイコプラズマによる発生機序(臨床獣医, 2017, 2)

[14]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）

[15]Zoetis：牛呼吸器病症候群（BRDC）(<https://www.zoetis.jp/ls/cattle/sick/brdc/>)