

# 迅速発育型非結核性抗酸菌が分離された乳房炎

○佐藤聖子、中島博美、矢彦沢小百合  
(長野県伊那家畜保健衛生所)

## 要約

当所の乳汁細菌検査(乳汁検査)では、検査結果を回答する際には通常 48 時間以内に発育する菌のみを回答している。今回、管内 1 酪農場の乳汁検査で、48 時間以内の培養でコロニーを形成しなかったが、後日の同一個体の再検査にて 48 時間以上の培養を行ったところ多剤耐性のグラム陽性短桿菌を分離した。当該牛は治療するも回復せず、分娩後に予後不良で廃用となった。と畜検査にて乳房の広範囲壊死と全身状態の悪化を確認した。その後、細菌の同定検査にて迅速発育型非結核性抗酸菌(RG-NTM)である *Mycobacterium fortuitum* (以下 *M. f*) と判明した。また、当該牛はヨーネ病エライザ(ELISA)検査で陽性、リアルタイム PCR 検査で陰性となり、ELISA 検査はヨーネ菌以外の抗酸菌に非特異的に反応したと推察された。その後の敷料等の牛舎内環境検査では *M. f* は検出されなかった。*M. f* 等の RG-NTM による乳房炎は、通常の乳汁検査では分離困難であり、数回の乳汁検査でコロニーを形成せず、ヨーネ病 ELISA 検査で非特異反応を示す個体の乳房炎の原因菌は、培養時間の延長等で分離できる可能性がある。今回の菌種の同定は今後の乳汁検査方法の一助と考えられた。

## 1 はじめに

非結核性抗酸菌 (NTM: non-tuberculous mycobacteria) とは、結核菌群を除いた培養可能な抗酸菌の総称で、現在120菌種以上の存在が確認されている。その非結核性抗酸菌のうち、培養すると7日以内にコロニーを形成する菌が迅速発育菌 (RG: rapid growers) と分類され、迅速発育型非結核性抗酸菌 (RG-NTM) と総称される<sup>[1]</sup>。一方で、近年、一般的な乳汁細菌検査で原因菌の生えない No Growth乳房炎 (以下NG乳房炎) が問題となっている (図1)。また、非結核性抗酸菌性の乳房炎の報告はあるが、診断や菌分離は困難なことが多いため、これらの分離困難な乳房炎は一概にNG乳房炎と判定されることが多いと考えられる。今回、管内一酪農場で一度はNG乳房炎と判定されたものの、後日の再検査依頼で非結核性抗酸菌を分離した事例を紹介する。

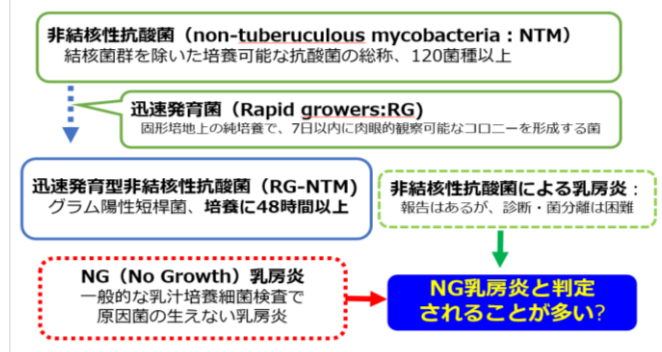


図1 非結核性抗酸菌の分類

## 2 発生概要

### 1) 農場概要

搾乳牛75頭、育成牛40頭の酪農場であり、飼養形態は繋留、対尻式の分離給与である。敷料の種類は入手時期により異なることがあり、かんなくず、もみ殻等である。

平成28年からのヨーネ病発生履歴はなく、令和元年から令和5年までの年間乳汁細菌検査は平均25件であった (図2)。

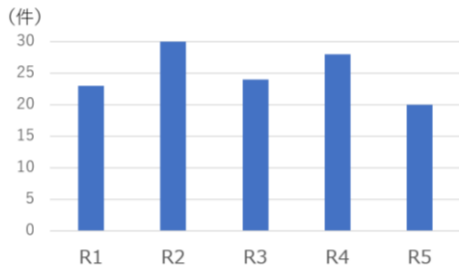


図2 年間乳汁検査件数

## 2) 経過

本事例の経過を表1に示した。当該牛は令和3年9月11日生まれ、令和6年4月25日の時点で産歴2産のホルスタイン種の雌であり、同日最初の乳汁細菌検査では、48時間培養後もコロニーの形成はなかった。翌月の5月16日、再検査の依頼があり、24時間培養ではコロニーは形成されず、48時間以上の培養を実施したところ、96時間後にBAにて辺縁不整な白色乾燥コロニーが認められたため、薬剤感受性検査を実施した。その結果、多剤耐性であることが判明し、5月23日、松本家畜保健衛生所病性鑑定課に同株の菌種同定を依頼した。

6月3日、感受性を示したいずれの薬剤による治療にも反応せず、3度目の検査依頼があり、48時間の培養で5月20日に分離されたコロニーと同様のコロニーを分離した。

6月24日、定期ヨーネ病ELISA検査で陽性を示し、その後のPCR確定検査で陰性が確認された。

7月30日、当該牛が乾乳となり、乾乳期治療が開始された。

9月29日に分娩するも、10月16日に泌乳量が減少、採食量も低下とのことで再度乳汁を採材、4度目の乳汁細菌検査を実施、48時間以上の培養により、同様の菌が分離された。10月22日、乳房全体の硬結、腫脹を呈し泌乳停止から、起立不能により廃用決定となった。

また、ヨーネ病の定期検査及びと畜時のヨーネ病ELISA検査結果は、いずれもヨーネライザKSで陽性とされる吸光度0.3以上であった。

表1 事例の経過

日付	項目	詳細	備考
4/25	①乳汁細菌検査	48時間培養後もコロニー形成なし	
5/16	②乳汁細菌検査	24時間培養後もコロニー形成なし	培養時間の延長
5/20		96時間後、BAにて辺縁不整白色乾燥コロニー生育	薬剤感受性検査実施
5/21	薬剤感受性検査	多剤耐性を確認	
5/22	菌種同定	病性鑑定課へ依頼	
6/3	③乳汁細菌検査	感受性薬剤の治療に効果なし、再検査 48時間の培養で同様のコロニー分離	
6/24	ヨーネ病 ELISA検査	ELISA【陽性】→realtimePCR【陰性】	非特異的反応
7/30	乾乳（乾乳期治療）		
9/29	分娩		
10/16	④乳汁細菌検査（ <i>M.f. ortuitum</i> 分離）	48時間以上培養	
10/22	乳房全体腫脹、泌乳停止→ 廃用		

## 3 材料及び方法

### 1) 乳汁の細菌検査及び薬剤感受性検査

#### ①細菌検査

5%羊血液加寒天培地（BA, 日本ベクトン・ディッキンソン株）、DHL寒天培地（DHL, 島津ダイアグノスティクス株）、エドワード寒天培地（Ed, 関東化学株）、X-SA寒天培地（X-SA, 島津ダイアグノスティクス株）、マンニット食塩加寒天培地（Mn, 日本ベクトン・ディッキンソン株）及びサブロー寒天培地（Sab, 日水製薬株）の6種類の培地で37℃、5%CO<sub>2</sub>環境下で24時間培養し、その後、原因菌が分離されなければ48時間まで延長培養した。

#### ②薬剤感受性検査

薬剤感受性検査はベンジルペニシリン（PCG）、アンピシリン（ABPC）、セファゾリン（CEZ）、セフトキシム（CXM）、ストレプトマイシン（SM）、フラジオマイシン（FRM）、カナマイシン（KM）、エリスロマイシン（EM）、テトラサイクリン（TC）、エンロフロキサシン（ERFX）及びマルボシル（MAR）を用いて常法に従い実施し、阻止円形成の有無を確認した。

#### ③菌種同定

5月20日及び10月16日に分離した菌株について、16SリボソームRNAシーケンス解析により菌種同定を実施した。

### 2) と畜時検査

#### ①と畜検査及び組織学的検査

と畜検査の所見確認後、主要臓器をホルマ

リン固定し、常法に従い HE 染色を行い、組織学検査を実施した。

## ②細菌学検査

と畜後の 5 臓器、乳腺組織及び血液に対し、1) ①と同様に細菌検査を実施した。また、市販の同定キット (API® Coryne、ビオメリュー株) による菌種同定も行った。

## 3) 牛舎の環境検査

牛舎の汚染状況を調べるため、当該牛のと畜後、本牛が居た牛床周辺の拭き取り材料と、牛舎各所での敷料の環境検査 (図 3) を行った。拭き取り材料及び敷料の計 13 検体は BA、DHL 寒天培地を用い 37°C で最大 96 時間まで好気培養し、3 検体はヨーネ菌用培地 (共立製薬株) を用い 37°C で培養した。

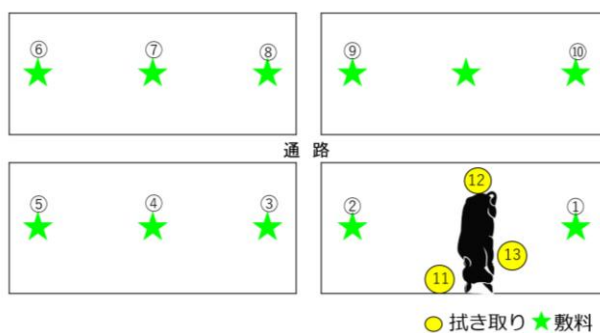


図 3 牛舎の環境検査

## 4 結果

### 1) 乳汁の細菌検査及び薬剤感受性検査

#### ①細菌検査

分離菌は BA に発育し、グラム染色で難染色性を示すグラム陽性微小短桿菌で、培地への固着はなく、抗酸菌染色により抗酸性を示す菌体と、周辺に菌糸様の形態が認められた。また、ヨーネ菌用培地にも 48 時間培養後に微小な黄白色コロニーの発育が多数認められた (図 4)。

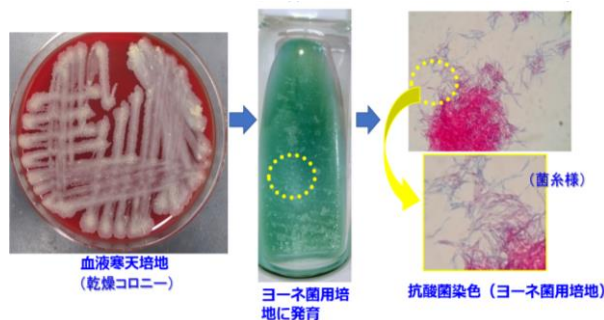


図 4 分離菌の性状

#### ②薬剤感受性検査

FRM、KM、ニューキノロン系薬剤 (ERFX、MAR) に対し感受性であったが、その他多くの薬剤への耐性が確認された (表 2)。

表 2 薬剤感受性検査

薬剤	阻止円 (mm)	薬剤	阻止円 (mm)
ベンジルペニシリン PCG	6	カナマイシン KM	21
アンピシリン ABPC	6	エリスロマイシン EM	6
セファゾリン CEZ	6	テトラサイクリン TC	6
セフトキシム CXM	6	エンロフロキサシン ERFX	38
ストレプトマイシン SM	6	マルボシル MAR	40
フラジオマイシン FRM	17		

#### ③菌種同定

それぞれの菌株について、1414bp の塩基配列が決定され、その結果 *Mycobacterium fortuitum* (以下 *M. fortuitum*) に対して最も一致率が高かった (表 3)。

表 3 菌種同定

#### ①5/16分離株

順位	菌種名	一致率 (%)
1	<i>Mycobacterium(M.) fortuitum subsp. acetamidolyticum</i>	99.93
2	<i>M. fortuitum subsp. fortuitum</i>	99.93
3	<i>M. senegalense</i>	99.49

#### ④10/16分離株

順位	菌種名	一致率 (%)
1	<i>M. fortuitum subsp. acetamidolyticum</i>	100.00
2	<i>M. fortuitum subsp. fortuitum</i>	100.00
3	<i>M. senegalense</i>	99.58

【*M. fortuitum* : 一致率が最も高い】

### 2) と畜時検査

#### ①と畜検査及び組織学検査

と畜時の剖検所見では乳房全体の腫脹、硬結、チアノーゼ及び剖面組織の広範な壊死が認められ、ほぼ固有構造を失っていた。また、

複数の腎梗塞とみられる所見と、子宮内膜炎も認められ、全身状態の悪化が示唆された（図5）。組織学検査においては、乳腺組織の広範な壊死と線維化、乳腺内腔における上皮細胞と炎症細胞との壊死崩壊物と細菌塊が認められ、壊死した乳腺内腔にグラム陽性桿菌がみられたが、抗酸菌染色による抗酸菌像は認められなかった。このことは、2次感染による悪化で抗酸菌検出が困難になったことによると推察された（図6）。

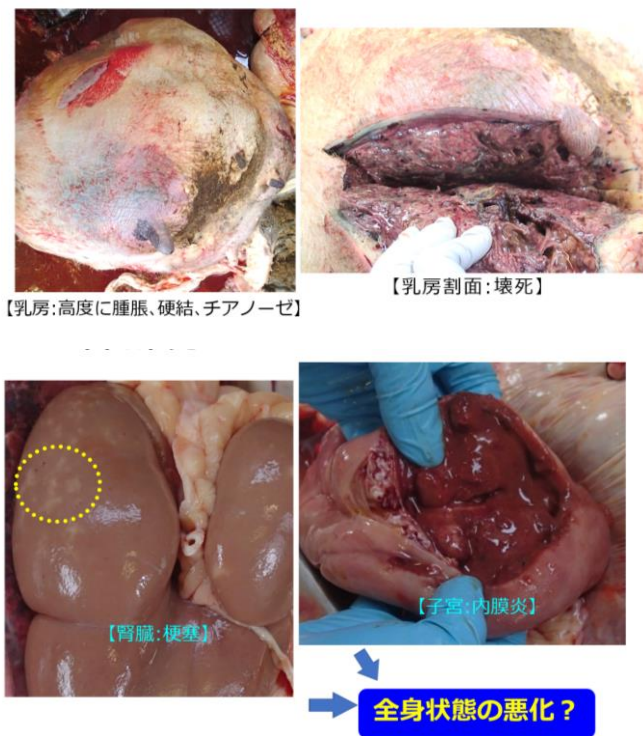


図5 と畜時の剖検所見

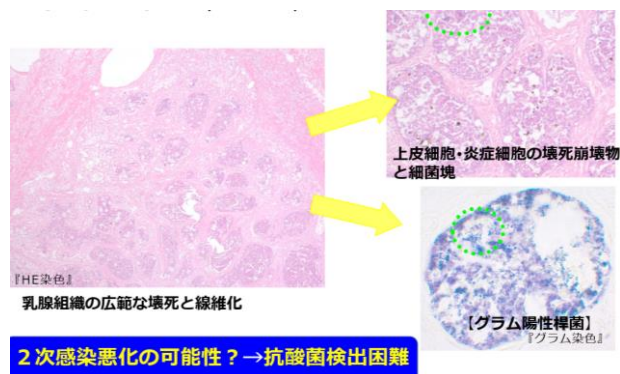


図6 組織学的所見

### ②細菌検査（乳腺組織）

乳腺組織からグラム陽性の微小短桿菌が分離され、市販同定キットの結果では *Trueperella pyogenes* であり、二次感染に

よる可能性が考えられ、組織所見の結果と一致した（図7）。抗酸菌はいずれの臓器及び血液からも分離されなかった。

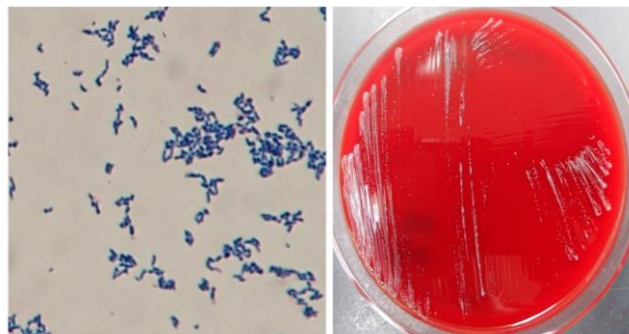


図7 乳腺組織からの細菌分離検査結果

### 3) 牛舎の環境検査

採取した13検体全てにおいて、腸内細菌は  $10^7$  cfu/g 以下であり（表4）、抗酸菌は分離されなかった。このことから、牛舎内に *M. fortuitum* が高濃度に常在していた可能性は低いと考えられた。

表4 牛舎の環境検査

	敷料①	敷料②	敷料③	敷料④	敷料⑤
腸内細菌	$8.4 \times 10^4$	$1.6 \times 10^5$	$4 \times 10^5$	$4 \times 10^6$	$8 \times 10^7$
	敷料⑥	敷料⑦	敷料⑧	敷料⑨	敷料⑩
腸内細菌	$1.6 \times 10^6$	$1.0 \times 10^7$	$1.84 \times 10^5$	$1.2 \times 10^6$	$2.52 \times 10^5$
	ふきとり①	ふきとり②	ふきとり③		
腸内細菌	$1.3 \times 10$	0	$2.2 \times 10$		

### 5 考察

*M. fortuitum* はグラム染色で難染性を示すグラム陽性短桿菌の迅速発育型非結核性抗酸菌（RG-NTM）である。特徴として血液寒天培地上で発育に2～7日を要し、通常の乳汁細菌検査では検出が困難である。土壌や水中など自然環境中に常在しており、宿主の免疫状態悪化などの際に日和見的に病変を起こすとされている。マイコバクテリウム属菌の中ではRunyon分類での分類4の迅速発育菌に属し、ヒト医療における病原性としては、環境から日和見的に感染が起こり、外傷や手術後の皮膚感染症や免疫抑制状態での呼吸器感染症が主であるが、ヒトからヒトへは感染しない。牛では肉芽腫性肺炎等の報告があり

[2]、海外では乳房炎を引き起こすとの報告もある[3]。

また、非結核性抗酸菌と乳房炎との関連を調べた。定期ヨーネ病検査において、平成27年より検査方法がELISA検査2回の実施から、確定検査にPCRを用いる方法となった。そこで、平成28年以降の7年間の、当所の非特異反応との関連を調査したところ、過去7年間の非特異反応の合計件数は62件であり、うち乳房炎の検査依頼は7件であった。そのうち、菌が分離されず、NG乳房炎と回答した件数は1件であった。その他にも、非特異反応を示した牛の乳房炎検体のうち *Trueperella* 属、*Corynebacterium* 属と回答したなかで多剤耐性株があり、このような乳房炎は抗酸菌性の乳房炎であった可能性が推察される(図8)。

要であると考えられた。

#### 【参考文献】

- [1] 斎藤、抗酸菌属のグループと主な菌種 (2007)
- [2] 入部ら、26. 牛胎子の *Mycobacterium fortuitum* による肉芽腫性肺炎, 農業・食品産業技術総合研究機構 家畜衛生研修会 (2010)
- [3] L.Cvetnic et.al.: Bovine mastitis caused by rapid-growth environmental mycobacteria, *VETERINARSKA STANICA* 53(5), (2022)

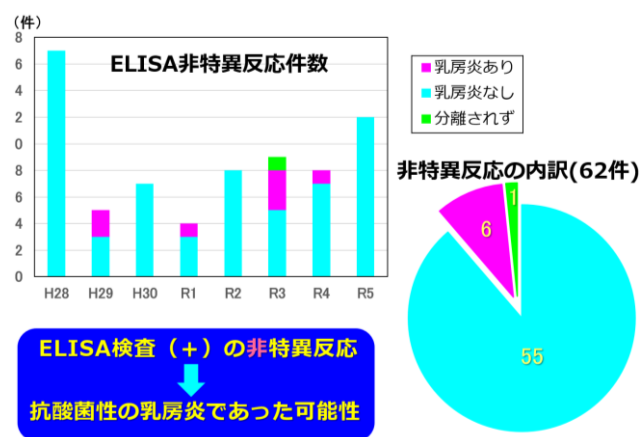


図8 ヨーネ病非特異反応との関連

## 6 まとめ

*M. fortuitum* 等の迅速発育型非結核性抗酸菌は、定型の乳汁細菌検査では分離することが困難であり、多くはNG乳房炎とされてしまうことが多いと考えられる。乳房炎の牛において、抗酸菌感染が疑われるものは次の4つである。①同一個体で、数回にわたる検査で菌が分離されないこと。②ヨーネ病ELISA検査で非特異反応を示すこと。③治療に反応しないこと。④48時間以上の培養で菌分離できる可能性があること。また、抗酸菌性の乳房炎は日和見感染であり、牛の全身状態が悪化していることが示唆され、当病を診断した際は今後の治療方針決定や予後判定にも重