

46 牛マイコプラズマ乳房炎

| 担当      | 検査チャート   |
|---------|--|
| 家畜保健衛生所 | <pre> graph TD     A["(1) 疫学調査"] --&gt; B["(2) 臨床検査"]     A -- "(死亡牛)" --&gt; C["(3) 剖検"]     A -- "(乳汁)" --&gt; D["(4) 細菌培養試験"]     B --&gt; C     C --&gt; E["(7) 病理組織検査"]     D --&gt; F["(5) 細菌性状分析"]     F --&gt; G["(6) PCR"]     F --&gt; H["(8) 免疫組織化学検査"]     G -- "(+)" --&gt; I["血清型別"]     G -- "(-)" --&gt; J[" "]     I --&gt; K["(+)" ]     I --&gt; L["(-)" ]     E -- "(+)" --&gt; M["(+)" ]     E -- "(-)" --&gt; N["(-)" ]     H -- "(+)" --&gt; M     H -- "(-)" --&gt; N     </pre> |
| 病性鑑定施設  | <p>(4) 細菌培養試験</p> <p>&lt;分離培養&gt;</p> <p>(5) 細菌性状分析</p> <p>(6) PCR</p> <p>(+) (-)</p> <p>血清型別</p> <p>(+) (-)</p> <p>(+) (-)</p> <p>(+) (-)</p>   |
| 判定・結果   | <p>(+) (-) (+) (-)</p>   |
| 最終判定    | <p>臨床症状の確認、並びに原因菌の検出または分離により最終判定を行う。</p>   |
| その他     | <p>分離マイコプラズマの血清型別並びに免疫組織化学検査が必要な場合は、動物衛生研究所等の専門機関へ依頼する。</p>  |

## →類似疾病検査

- ① 他の細菌性乳房炎
- ② 47 プロトテカ乳房炎

○ 病原体: *Mycoplasma alkalescens*、*M. bovis genitalium*、*M. bovirhinis*、*M. bovis*、*M. californicum*、*M. canadense*

### (1) 疫学調査

- ① 泌乳期の牛が感染する。
- ② 発生に季節的変動はない。
- ③ 伝染力は強く、集団発生することがある。
- ④ 搾乳時に汚染乳汁を介して伝播することが多い。
- ⑤ 新しく牛を導入した直後に発症しやすい。
- ⑥ 呼吸器病から続発することもある。

粘膜に直径1～3mmの小結節が認められることもある。

乳房上リンパ節は腫大し、ときに著しい。

### (4) 細菌培養試験(分離培養)

確定診断は菌分離による。様々な菌種が乳房炎原因菌として報告されているが、中でも *M. bovis* は分離頻度が最も多く感染性、起病性が高い。

### (2) 臨床検査

- ① 泌乳量が短期間に激減する。
- ② 乳汁に多数の好中球が浸潤し、乳汁成分と凝集塊を形成する。軽度の場合は肉眼的な変化は分かりにくい、重度の場合は乳汁の固体成分と液体成分の分離や、粘性の高い乳汁の分泌が認められる。
- ③ 臨床症状があるにもかかわらず一般細菌が分離されない。
- ④ 泌乳量の低下あるいは無乳が長期間持続する場合がある。
- ⑤ 罹患乳房は発赤、腫脹するが、疼痛を伴わない場合がある。
- ⑥ 発症牛では抗生物質による治療は成功しない場合が多い。
- ⑦ 菌分離陽性の不顕性感染牛もある。導入時に感染源となる。

① 乳汁をDNA添加変法 Hayflick 寒天培地および液体培地を用いて分離培養する。37℃で2～7日間5～10%炭酸ガス培養を行う。

② 液体培養菌はカラーチェンジ後、①の寒天培地に1エーゼを塗抹して分離培養する。また、100μlを15,000rpmで5分遠心し、沈殿からDNAを精製し、PCRを行うとよい。残った液体培養菌は-60℃以下で数年間安定して保存できる。

③ 実体顕微鏡下(10～50倍率)で目玉焼き状の集落が発育すればマイコプラズマである。良く分離独立した集落を寒天培地ごと切り出して液体培地に接種すると純培養菌が得られる。

### (3) 剖 検

- ① 罹患乳房は通常種々の程度に腫脹し硬結する。後期には弛緩し萎縮する。鶏卵大から拳大の膿瘍結節が触知あるいは肉眼で分かる。
- ② 分房の断面は黄色あるいは灰色がかり、ときに肉様を呈する。小葉が断面から浮き上がる傾向がある。通常膿様物がみられ、乳細管内にポケットや硬化した膿もよく認められる。乳槽や乳管

### (5) 細菌性状分析

(分離菌の性状)

グルコースとアルギニンの分解性は、菌種同定の際重要な検査項目となる。これらの分解性はグルコースおよびアルギニン添加液体培地のカラーチェンジで判定できる。なおグルコースとアルギニンを分解しない菌種でもわずかに黄変を示す。

(分離菌の生化学的性状)

| 菌種                       | グルコース分解能 | アルギニン分解能 | フィルムスポット産生能 |
|--------------------------|----------|----------|-------------|
| <i>M. alkalescens</i>    | —        | +        | —           |
| <i>M. bovigentialium</i> | —        | —        | +           |
| <i>M. bovirhinis</i>     | +        | —        | —           |
| <i>M. bovis</i>          | —        | —        | +           |
| <i>M. californicum</i>   | —        | —        | —           |
| <i>M. canadense</i>      | —        | +        | —           |

(6) P C R

PCR<sup>1), 2)</sup>、16SrRNAの塩基配列解析は菌種同定の際に補助診断法として利用できる。

(7) 病理組織検査

- ① 急性期は小胞や乳細管に好中球が充満するのが特徴的であり、これらは次第に単核球に置き換わる。
- ② 亜急性期は小リンパ球の浸潤と小胞の萎縮を伴う小胞結合織の肥厚、および乳管上皮の過形成と乳管周囲へのリンパ球浸潤による肉芽腫形成が認められる。
- ③ 後期は浸潤細胞が消失し結合組織が肥厚する。ただし一般細菌による乳房炎に比べて結合組織の肥厚は軽度である。

(8) 免疫組織化学検査

病変部に *M. bovis* 抗原を検出する。

その他:

分離培地は、DNA 添加変法 Hayflick 培地を用いる。

(液体培地)

|                            |       |
|----------------------------|-------|
| Bacto PPLO broth w/o CV    | 2.1g  |
| ブドウ糖                       | 1.0g  |
| 蒸留水                        | 70ml  |
| (高圧滅菌121℃、15分、下記を無菌的に加える。) |       |
| 1%フェノールレッド                 | 0.2ml |
| 非働化馬血清                     | 20ml  |
| 25%酵母エキス(自家製)              | 10ml  |
| 5%酢酸タリウム                   | 0.5ml |
| 20万単位/mlペニシリンG             | 0.5ml |
| 0.2%DNA*                   | 1.0ml |
| pH7.6~7.8に修正               |       |

\*蒸留水で煮沸して溶かす。

- 1) 全てを混合し pH を修正後グラスウール製のプレフィルターを併用して 0.2µm のメンブランフィルターでろ過滅菌してもよい。
- 2) アルギニン分解性マイコプラズマも検査対象とする場合はアルギニン塩酸塩を 0.2g 添加し、pH を 7.2 とする。

(寒天培地)

|  |
|--|
| 蒸留水20mlで調製した2倍高濃度の液体培地と、オートクレーブ滅菌した1.3%アガロースまたは2%精製寒天50mlを50℃で混合して平板を作製する。 |
|--|

(血清型別)

マイコプラズマの菌種同定は抗血清を用いた血清型別(間接酵素抗体法、発育阻止試験、代謝阻止試験等)により行う。ただし、抗血清は市販されていない。血清型別が必要な場合、動物衛生研究所などの専門機関に依頼する。

(参考文献)

- ・清水高正: マイコプラズマとその実験法(尾形 学監修). 125-128、近代出版、東京(1988).
- 1) Subramaniam, S., et al.: Mol. Cell. Probes. 12, 161-169(1998).
- 2) Kobayashi, H. et al.: J. Vet. Med. Sci. 60, 1299-1303(1998).