

8 子牛の *Mannheimia haemolytica* 血清型 2 型による壊死性線維素性胸膜肺炎の一症例

中央家畜保健衛生所

○小池 絵理子・石原 径佳・中井 悠華

I はじめに

Mannheimia haemolytica (Mh) は、牛パストレラ (マンヘミア) 症の原因菌の一つであり、牛に呼吸器症状をひきおこす。本症は、年間を通じて発生が認められ、飼育環境・気候の急変、長距離輸送等のストレスが加わったときに発生することが多い。血清型は莢膜抗原の違いにより 12 種類に分類される。国内の分離株は、血清型 1 型の分離割合が高く、次いで 6 型、2 型、型別不能の順¹⁾ であり、県内では血清型 1 型、6 型、型別不能の順²⁾ で、2 型は分離されていない (図 1)。なお、県内のデータは、平成元年から 25 年に呼吸器症状を呈した 42 頭の牛の肺または鼻腔スワブから分離された株について示した。血清型 2 型は、1 型及び 6 型と比較すると牛に対する病原性は弱い、又は、ないと報告されている¹⁾ が、今回、子牛が血清型 2 型による肺炎を発症し、死亡した事例に遭遇したので報告する。

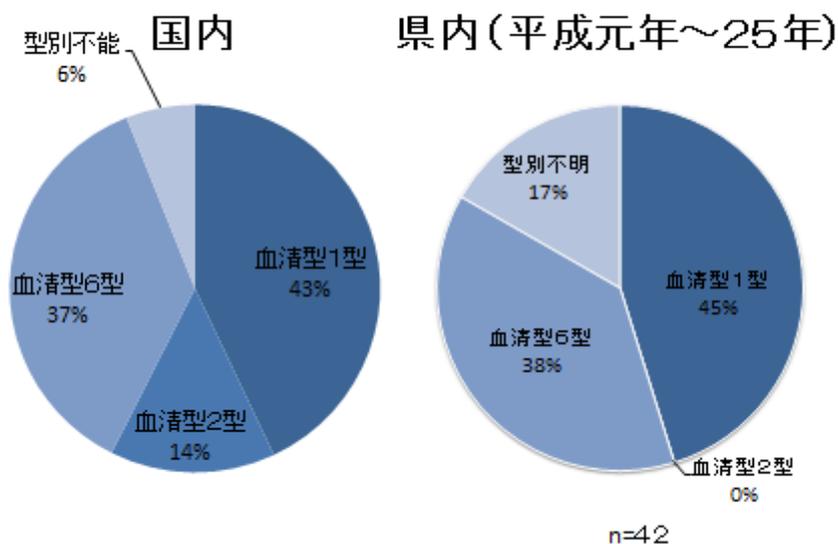


図 1 Mh の血清型別分離割合

II 発生概要

搾乳牛 130 頭、育成牛 5 頭、子牛 15 頭を飼養する農場において、平成 30 年 4 月 5 日に出生した子牛が、翌 6 日に初乳を摂取した際に誤嚥した。7 日に起立不能となり、8 日には肺雑音が聴取され、体温は 37.4℃であった。管理獣医師により、アンピシリン、ネオアス注射液（東亜薬品工業株式会社）、バナミン注射液 5%（DS ファーマアニマルヘルス株式会社）を含む酢酸リンゲルの補液が行われたが、9 日朝に死亡が確認された。

III 材料及び方法

1 材料

死体 1 検体を病性鑑定に供した。

2 方法

(1) 病理学的検査

病理解剖を実施した後、10%中性緩衝ホルマリン液に浸漬した 5 臓器について、病理組織学的検査を実施した。病理組織学的検査では、5 臓器を材料にヘマトキシリン・エオジン（HE）染色での一般染色、肺を材料にグラム染色、リントングステン酸・ヘマトキシリン（PTAH）染色、過ヨウ素酸シッフ反応（PAS）を実施した。さらに、肺について、家兎抗 Mh 血清型 2 型抗体及び家兎抗 *Actinobacillus suis* (As) 抗体（動物衛生研究部門）を用いた免疫組織化学的検査を行った。

(2) 細菌学的検査

5 臓器及び胸水を材料として、5%羊血液加コロンビア寒天培地（5%CO₂48 時間培養）及び DHL 寒天培地（好気 24 時間培養）で分離培養を行った。分離菌について、コロニー形状の観察、グラム染色、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、簡易同定キット（アピ 20NE（シスメックス・バイオメリユー株式会社）及び ID テスト HN-20 ラピッド（日水製薬株式会社））を用いて同定を実施した。さらに、Mh 様菌について、Alexander らが報告した *Mannheimia* 属菌同定用 Multiplex PCR 法³⁾、PCR で増幅した 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定し、EzBioCloud 及び NCBI BLAST tool で相同性検索を行った。また、スライド凝集法による血清型別を行った。

Actinobacillus 属様菌について、Mh と同様に 16S rRNA 遺伝子解析を実施し、さらに、PCR で増幅したハウスキーピング遺伝子 *recN*、*rpoB*、*infB* の塩基配列を決定し、NCBI BLAST tool で相同性検索を行った。

(3) ウイルス学的検査

肺を材料に作製した乳剤を用いて、牛 RS ウイルス⁴⁾、牛パラインフルエンザウイルス 3 型⁵⁾、牛コロナウイルス⁶⁾、牛伝染性鼻気管炎ウイルス⁷⁾について遺伝子検査を行った。

IV 検査成績

1 病理学的検査

(1) 剖検所見

胸腔には混濁した暗赤色の胸水が重度に貯留していた。肺は全体が水腫様で、左右前葉、中葉、副葉は暗赤色で硬結感があり、表面には線維素の付着がみられた(図2)。肺門リンパ節は腫脹し、心嚢には線維素が付着していた(表1)。



図2 剖検所見

表1 剖検所見

部 位	所 見
出生日・性別	雄
死殺の別	斃死
外 貌	著変なし
皮下組織	著変なし
腹 腔	著変なし
胸 腔	胸水重度貯留(暗赤色混濁)
肝 臓	脆弱、剖面黄褐色
脾 臓	著変なし
腎 臓	脆弱
心 臓	心嚢に線維素、ゼリー状物付着
肺	右前葉、中葉、後葉頭側、副葉: 暗赤色、硬結感あり、表面に線維素付着 左前葉、後葉頭側: 暗赤色、硬結感あり、表面に線維素付着 肺門リンパ節: 腫脹、暗赤色
消化器系	胃～直腸: 著変なし
その他	胸腺: 著変なし

(2) 病理組織学的検査

肺において、出血、凝固壊死巣が多発し、壊死巣は燕麦様細胞に包囲されていた(図 3)。周囲の細気管支及び肺胞腔内には、好中球、剥離細胞、漿液が充満していた。中小動脈の血管壁ではフィブリノイド変性がみられ(図 4)、小葉間結合組織や肺胸膜は水腫性に拡張し、炎症細胞浸潤を伴っていた(図 5)。PTAH 染色では、壊死巣周囲や肺胸膜が濃青色に染色され、線維素の析出が確認された。PAS 反応では、真菌は認められなかった。グラム染色を実施したところ、肺胞腔に炎症細胞と混在してグラム陰性菌が多数観察された。肺の免疫組織化学的検査では、壊死巣周囲に浸潤している燕麦様細胞の周囲、重度の壊死及び炎症がみられた血管の血管壁、胸膜の線維素性壊死性病変に抗 Mh 血清型 2 型抗体に対する陽性反応が認められた(図 3、4、5)が、抗 As 抗体に対する陽性反応は認められなかった。その他の臓器に著変は認められなかった(表 2)。

表 2 病理組織学的検査成績 (HE 染色)

部 位	組 織 変 化	No.1
肝 臓	死後変化	++
	胆汁栓	+
脾 臓	死後変化	+
腎 臓	死後変化	+++
心 臓	死後変化	++
	左心室:内膜うっ血	+
肺	死後変化	++
	肺胸膜:拡張、水腫、出血、線維素析出、好中球、リンパ球、マクロファージ浸潤、細胞退廃物貯留	+++
	小葉間結合組織:拡張、水腫、出血、線維素析出、好中球、リンパ球、マクロファージ浸潤、細胞退廃物貯留	+++
	気管支:腔内に好中球浸潤、細胞退廃物貯留、周囲に水腫	++
	肺胞:凝固壊死、燕麦様細胞、好中球浸潤、細胞退廃物、漿液貯留、線維素析出	+++
	肺動脈(小血管):血管壁水腫、好中球浸潤、フィブリノイド変性	+++
	:血栓	+
肺門リンパ節:死後変化、辺縁洞に出血、うっ血、好中球浸潤	++	
その他	気管:死後変化	+++

+: 軽度、++: 中等度、+++ : 重度

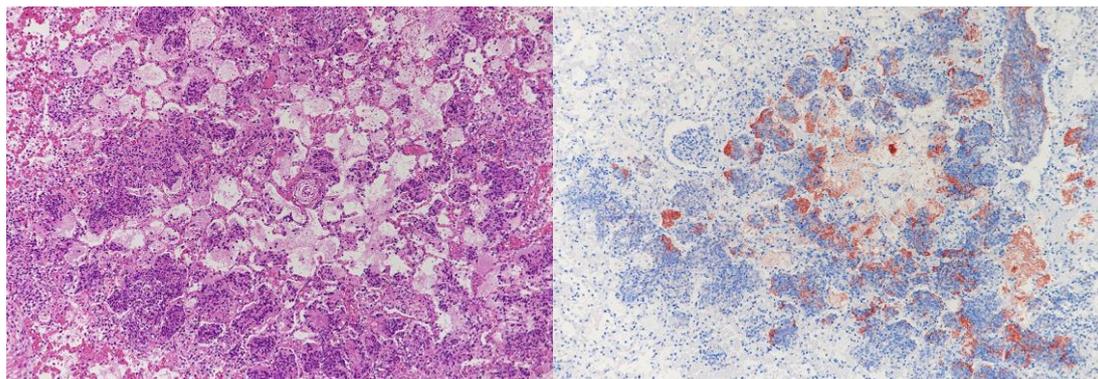


図 3 肺 燕麦様細胞に包囲された壊死巣

左側は HE 染色像、右側は同部位の家兎抗 Mh 血清型 2 型抗体を用いた免疫組織化学的検査像を示す（陽性反応は赤褐色部分）

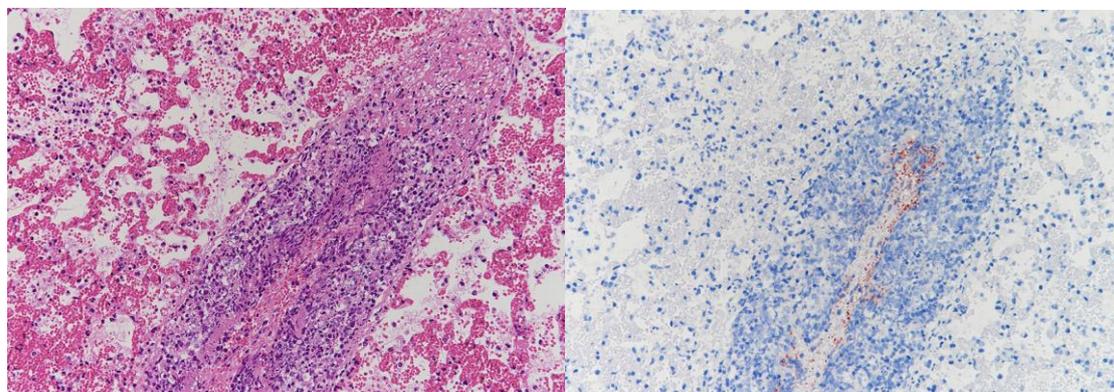


図 4 肺 壊死性血管炎

左側は HE 染色像、右側は同部位の家兎抗 Mh 血清型 2 型抗体を用いた免疫組織化学的検査像を示す（陽性反応は赤褐色部分）

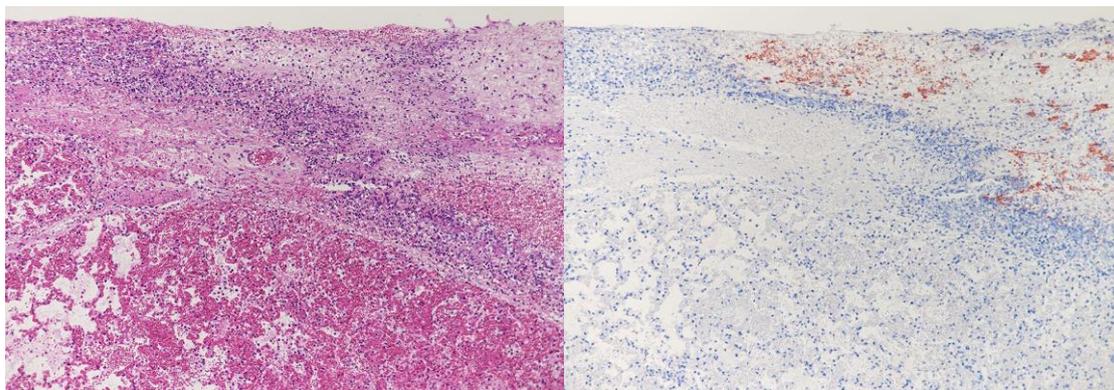


図 5 肺 線維素性胸膜炎

左側は HE 染色像、右側は同部位の家兎抗 Mh 血清型 2 型抗体を用いた免疫組織化学的検査像を示す（陽性反応は赤褐色部分）

2 細菌学的検査

肺、心臓、胸水から 2 種類のグラム陰性桿菌が分離され (表 3)、それぞれ Mh 及び *Actinobacillus* 属菌と推定された (表 4)。

分離菌 1 は、PCR、16S rRNA 遺伝子解析、スライド凝集法により Mh 血清型 2 型と同定された。

分離菌 2 について 16S rRNA の遺伝子解析を実施した。98.7~99% 以上の相同性がある場合、同一菌種の可能性が高いと考えられているが、EzBioCloud による各菌種の基準株との相同性検索の結果、98.7% 以上の相同性を示す菌種が As を含め複数あった。さらに、NCBI BLAST tool を用いて、各菌種の基準株及び基準株以外の株との相同性検索を行ったところ、ウサギ (R80 株) 由来の As、ノウサギ (J3-241 株) 由来の As の順に高い相同性を示し、98.7% 以上の菌種が他に複数あった。以上から、16S rRNA 遺伝子解析では菌種同定に至らなかった。そこで、ハウスキーピング遺伝子の相同性検索を実施したところ、分離菌 2 の *recN* は、豚、ウサギ、ノウサギ由来の As とは 99.1% 以上の相同性を示した。既報では、*recN* の相同性 (SI*recN*) からゲノム全体の相同性 (SI*genome*) の推定が可能⁸⁾ であり、SI*genome* 値が約 0.85 以上あれば同一菌種とされている⁹⁾。計算した結果、As に対しての SI*genome* 値は 0.948~0.93、その他の菌種は 0.769 以下であった。また、*rpoB* の塩基配列は、ウサギ及びノウサギ由来の As と同一であり、次いで豚由来の As とは 98.1% の相同性を示した。*infB* の塩基配列は、ウサギ由来の As と最も高い相同性を示した。以上の検査から、分離菌 2 は As と同定された。

表 3 細菌分離成績

分離菌	肝	脾	腎	心	右肺	左肺	胸水
1	—	—	—	+	+++	+	+++
2	—	—	—	+	+++	+++	+

表 4 分離菌の性状及び簡易同定キットによる検査成績

分離菌	コロニー像	グラム染色像	カタラーゼ試験	オキシダーゼ試験	簡易同定キットのプロファイル	推定される菌種
1	正円、白色 溶血あり	グラム陰性 短桿菌	+	+	IDテスト:7007392	Mh
2	やや黄灰色 溶血なし	グラム陰性 小桿菌	—	+	IDテスト:7117773 20NE:1620004(24時間培養) :1660004(48時間培養)	<i>Actinobacillus</i> 属菌

3 ウイルス学的検査

すべて陰性であった。

V まとめと考察

本症例はパスツレラ（マンヘミア）症と診断された。病理組織学的検査において、壊死性線維素性胸膜肺炎がみられ、Mh 血清型 1 型及び 6 型による肺炎の所見¹⁰⁾と同様であった。Mh 血清型 2 型は病原性が弱いとされている¹⁾が、他県においても 3 日齢の子牛の臍帯炎に起因する腹膜炎の事例が報告されている¹¹⁾。本症例は、幼弱であったことや、初乳を誤嚥したことが要因となり、肺炎を発症したと推察された。

本症例から分離された As について、マンニット陽性であることや、16SrRNA 遺伝子の塩基配列解析の成績から、豚由来の As よりもウサギおよびノウサギ由来の As に類似した系統の As に近い株であると推察された。As は豚の扁桃や上部気道に常在しており、日和見感染や垂直感染により、主に子豚に敗血症、漿膜炎、心内膜炎、関節炎等をひきおこす¹²⁾。これまで As が牛から分離された報告はなく、本菌が死亡した牛の肺から有意に分離されたことは稀な事例と考えられた。しかし、免疫組織化学的検査において、肺の病変部に抗 As 抗体に対する陽性反応は確認されなかった。As の肺炎への関与の程度や牛に対する病原性について明らかにするために、今後、今回とは異なる抗 As 抗体を用いた免疫組織化学的検査等の追加検査が必要である。

VI 謝辞

本症例の発表にあたり、Mh の血清型別をしていただいた、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域病原機能解析ユニットの勝田賢先生、Mh 及び As の菌種同定をしていただいた同ユニットの伊藤博哉先生、免疫組織化学的検査をしていただいた同部門病態研究領域病理ユニットの木村久美子先生に深謝いたします。

VII 参考文献

- 1) 勝田 賢 (2013). 牛のパスツレラ症 明石 博臣ら(編) 牛病学 第 3 版 近代出版 pp. 267 - 270.
- 2) 荒井 理恵 (2013). 牛呼吸器病由来 *Mannheimia haemolytica* 株の性状調査および同定法に関する一考察 埼玉県検査研究成績報告書 (家畜保健衛生業績発表集録), 第 55 報.
- 3) Alexander, T.W. ら (2008). A multiplex polymerase chain reaction assay for the identification of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia glucosida* and *Mannheimia ruminalis*. *Vet. Microbiol.* **130**, 165-175.
- 4) Valarcher, J.F. ら (2007). Bovine respiratory syncytial virus infection.

Vet. Res. **38**, 153-180

- 5) Kirisawa, R. ら (1994). Detection of Bovine parainfluenza virus type 3, Bovine respiratory syncytial virus and Bovine viral diarrhoea mucosal disease virus infections by Polymerase Chain Reactions. *J. Rakuno Gakuen Univ.* **19**, 225-237.
- 6) Tsunemitsu, H. ら (1999). Experimental inoculation of adult dairy cows with bovine coronavirus and detection of coronavirus in feces by RT-PCR. *Arch. Virol.* **144**, 167-175.
- 7) Kamiyoshi, T. ら (2008). The presence of a deletion sequence in the BHV-1 UL49 homolog in a live attenuated vaccine for infectious bovine rhinotracheitis (IBR). *Vaccine.* **26**, 477-485.
- 8) Kuhnert, P. ら (2006). Prediction of whole-genome DNA-DNA similarity, determination of G+C content and phylogenetic analysis within the family *Pasteurellaceae* by multilocus sequence analysis (MLSA). *Microbiol.* **152**, 2537-2548.
- 9) Kuhnert, P. ら (2007). Emended description of *Actinobacillus capsulatus* Arseculeratne 1962, 38AL. *Int J Syst Evol Microbiol.* **57**, 625-632.
- 10) 播谷 亮 (2013). 牛の呼吸器病の病理 The Journal of Farm Animal in Disease Vol.2 No.3, 85-97.
- 11) 原田 奈美香 (2017). 牛の *Mannheimia haemolytica* 2型による膈帯炎に起因する腹膜炎 家畜衛生研修会(病性鑑定病理部門)提出事例参考資料.
- 12) 鎌田 寛 (2008). *A. suis* と子ブタの急性敗血症・関節炎 明石 博臣ら(編) 動物微生物学 朝倉書店 pp.207.