

3 和牛子牛にみられた *Mannheimia varigena* による化膿性髄膜炎

県北家畜保健衛生所

阿部祥次、小池新平、半田真明、蓼沼亜矢子、田中理栄子、金子大成

県央家畜保健衛生所

市川優、湯澤裕史

Mannheimia 属菌は、*Mannheimia haemolytica* complex (M.h.c)とも呼ばれ、1999年に *Pasteurella* 属から新たに分類された。M.h.cは現在 *M. haemolytica* (M.h)、*M. varigena* (M.v)、*M. glucosida*、*M. granulomatis*、*M. ruminalis* の少なくとも5菌種の存在が明らかになっている¹⁾。M.hは牛呼吸器病原菌の一つであり、ときに敗血症や髄膜炎を引き起こすことが知られている^{2,5)}。しかし、M.vは牛の肺炎、流産、髄膜炎、敗血症及び乳房炎、豚の腸炎など、呼吸器病以外でも様々な症状に關与するという報告はあるものの、海外・国内の発生例も少なく、他の3菌種の病原性を含めその状況は依然不明な点が多く残されている^{1,3,4,8)}。

現在、国内のM.v感染症は滋賀県、沖縄県、静岡県 の3県で確認され、滋賀県では牛の腸内容から菌が分離された腸炎(2005)、沖縄県では牛の脳及び主要臓器から菌が分離された敗血症(2007)、静岡県では豚の肝臓に巣状壊死を引き起こした症例(2008)が報告されている。

2009年、本県においても、和牛繁殖農家の新生子牛にM.vによる化膿性髄膜炎が確認されたので、その概要と管内の14戸の農場におけるM.v保菌状況調査の結果を報告する。

1 発生農場の概要

発生農場は母牛25頭(うち23頭は県外導

入牛)、子牛17頭を飼養する和牛繁殖農家であった。子牛は哺乳期の間、母牛と同居し、その後は200mほど離れた子牛牛舎で育成されていた。哺乳期用牛舎の隣には妊娠中の母牛群が飼養されていた。母牛には毎年1回アカバネ病生ワクチンが接種されていた。

2 発生経過

2009年11月20日、当該子牛(母牛は初産)は正常に娩出されたが、子牛は起立不能を呈し自力での哺乳意欲がなかったため、出生1時間後にチューブで代用初乳を強制投与した。その後も起立不能で哺乳意欲が改善されず、11月21日から23日に1日当たり4リットルの脱脂粉乳を2回に分けて強制投与した。24日に獣医師が初めて診療したが、リンゲル液の補液中に死亡が確認された。

3 材料と方法

(1) 細菌学的検査

当該子牛の実質臓器を用い、定法に従い5%羊血液寒天培地(37℃、10%CO₂)及びDHL寒天培地(37℃、好気)を用いて培養し、分離株の同定は市販の簡易同定キット(IDテスト・HN-20ラピッド[IDテスト]及びAPI20E)で実施した。16SリボゾームRNA(rRNA)の遺伝子配列の解析による同定は、(独)動物衛生研究所に依頼した。

(2) ウイルス学的検査

直腸便についてロタウイルス抗原検出キット（ロタスクリーン）を用いて行った。

（3）病理組織学的検査

定法に従いパラフィンブロックを作成し、HE染色、グラム染色、PAS反応及び抗M.v家兔血清による免疫染色（M.v免疫染色）を実施した。

（4）M.v保菌状況調査

2009年11月及び2010年9月から11月の間、管内の黒毛和種子牛及び母牛で実施した。供試牛は発生農場の同居牛（母牛11頭、子牛9頭、計20頭）と飼養規模が小規模から大規模な和牛繁殖農家13戸の子牛84頭、計104頭の鼻腔拭い液を用いた。方法は30cmの滅菌綿棒を用い鼻腔の深部から拭い液を採材し、PBS1mlに浸漬・保冷後、前述の方法で細菌学的検査を実施した（表1）。また、分離M.v株間の薬剤感受性試験（一濃度ディスク法）の成績及び簡易同定キットと16SrRNAの遺伝子配列解析の成績を比較した。

表1 M.vの保菌状況調査

保菌状況調査(発生時及び今年度8月～11月)
材料:発生農場の同居牛(母牛11頭、子牛9頭 計20頭)
管内和牛繁殖農家の子牛(84頭):鼻腔拭い液
↓
飼養頭数22頭～1,500頭(13戸)
各4～26頭
方法:滅菌綿棒(30cm)を用い採材
滅菌PBS 1mlに浸漬・保冷し輸送
細菌学的検査を実施(前述)



4 検査成績

（1）剖検所見

主な所見は左眼球の白色化、肺の全葉性び慢性出血、第四胃粘膜の多発性斑状出血、鼻梁の軽度左側湾曲、眼球の位置及び視線の左右非対称であった。脳を含む他の臓器等には

著変は認められなかった（図1）。

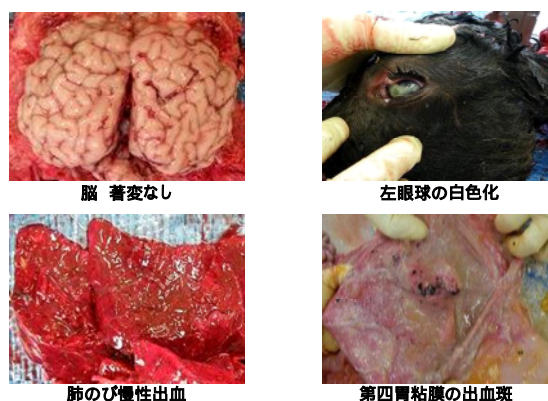


図1 剖検所見

（2）細菌学的検査

脾臓、腎臓、肺及び脳から溶血性のコロニーを形成するグラム陰性球桿菌が分離された。簡易同定キット（IDテスト）では当初、M.hと同定されたが、その後の16SrRNAの遺伝子配列解析によりM.vであることが判明した。

（3）ウイルス学的検査

直腸便からロタウイルス抗原が検出された。

（4）病理組織学的検査

脳の髄膜に多数の菌塊と好中球が浸潤する亜急性から急性の化膿性髄膜炎が観察された。眼球に多数の大規模な菌塊を伴った、亜急性から急性のブドウ膜炎と視神経周囲の化膿性炎が観察された。肺には菌塊を取り囲むエン麦細胞の出現を特徴とする急性の多発性巣状壊死が認められた。その他、接合菌による第四胃の真菌性胃炎、胸線の強い低形成が認められた（図2）。

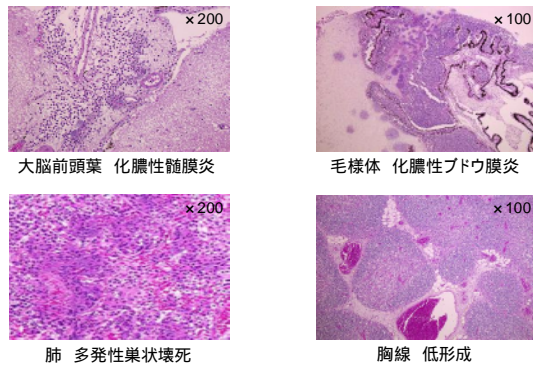


図2 病理組織学的所見 - 1

肺、脳、眼球で認められた菌塊は、グラム染色によりグラム陰性球桿菌であることが分かり、M.v免疫染色で陽性を示した(図3)。

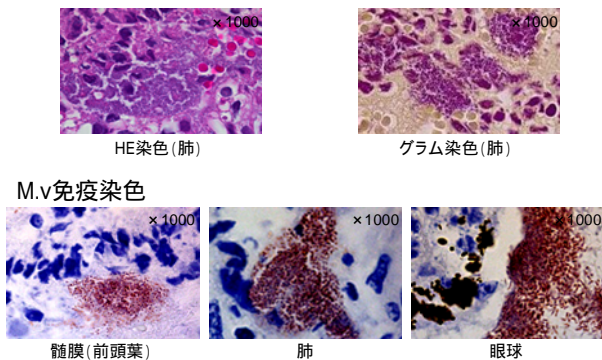


図3 病理組織学的所見 - 2

(5) 保菌状況調査

供試牛 104 頭のうち M.h.c は 13 株 (12.5%) 分離され、M.h は 8 株 (7.7%)、M.v は 3 株 (2.9%) 同定不可能な株は 2 株 (1.9%) であった。M.v が分離されたのは当該牛の母牛、同居牛及び他農場 (大規模農場) の子牛であった。その他に、*Pasteurella multocida* が分離された個体も認められた。

M.v の薬剤感受性試験では、当該牛脳由来と当該牛の母牛由来株では薬剤感受性試験成績は同じであった。同居母牛由来株ではオキシテトラサイクリンとカナマイシンで感受性であった。また、他農場の子牛由来株では、

アンピシリン、オキシテトラサイクリン、カナマイシンに耐性を認めた (表 2)。

表 2 保菌状況調査結果

104頭中M.h.cは13株(12.5%) M.h 8株(7.7%)
M.v 3株(2.9%)
不明 2株(1.9%)

当該牛の母牛、同居牛、他農場子牛

分離M.v株の薬剤感受性試験成績

	ABPC	OTC	KM	CEZ	FOM	ERFX	TP
当該牛脳由来	S	I	I	S	S	+++	++
当該牛の母牛	S	I	I	S	S	+++	++
同居母牛	S	S	S	S	S	+++	++
他農場子牛	R	R	R	I	S	+	+

ABPC:アンピシリン OTC:オキシテトラサイクリン KM:カナマイシン CEZ:セファゾリン
FOM:ホスホマイシン ERFX:エンロフロキサシン TP:チアンフェニコール
S:感性 I:中間 R:耐性 +++:高感受性 ++:中感受性 +:低感受性 -:耐性

簡易同定キットの成績と 16SrRNA の遺伝子配列解析の比較において、M.h.c は簡易同定キットにより *Actinobacillus pleuropneumoniae* (No.1、3、4、5、7、8、10、11、12、13) や、該当する菌が無い (No.3、6、12、13) 結果となり、株によっては 16SrRNA との成績と必ずしも一致するとは限らない結果となった (表 3)。

表 3 簡易同定キットの成績と 16SrRNAの遺伝子配列解析との比較

No	農場	年齢	IDテスト	API20E	16SrRNA	相同性
1	A	2月齢	A.pp 96% (7007351)	M.h 98.3% (1004024)	M.h	99.86%
2	B	1月齢	M.h 100% (3007250)	M.h 100% (0005024)	M.h.c	97%以下
3		1月齢	A.pp 100% (7007353)	- (1005726)	M.h.c	97%以下
4	C	1月齢	A.pp 100% (7007351)	M.h 98% (1001104)	M.h	99.86%
5		1月齢	A.pp 100% (7007351)	M.h 98.3% (1005024)	M.h	99.86%
6		1月齢	M.h 100% (7017253)	- (1115165)	M.v	99.12%
7		2月齢	A.pp 100% (7007351)	M.h 90% (1005124)	M.h	99.87%
8		3月齢	A.pp 100% (7007351)	M.h 98% (1001104)	M.h	99.87%
9		3月齢	M.h 100% (7007251)	M.h 90.5% (1115024)	M.h	99.53%
10		2月齢	A.pp 92% (7007350)	M.h 86.2% (0005104)	M.h	100%
11		1月齢	A.pp 92% (7007350)	M.h 86.2% (0005104)	M.h	100%
12		3歳	A.pp 96% (7007353)	- (1015736)	M.v	99.80%
13 当該		2歳	A.pp 96% (7007353)	- (3216037)	M.v	99.87%
当該		4日齢	M.h 90% (7007253)	M.h 90% (1005124)	M.v	99.73%

A.pp: *A. pleuropneumoniae*
- :不明

5 まとめ及び考察

今回の症例は、細菌学的検査で脾臓、腎臓、肺及び脳から M.v が分離されており、病理組織学的所見から胸線の低形成像が観察されたことから、免疫力低下に起因する敗血症性の

化膿性髄膜炎と診断した。また、組織病変が急性から亜急性であったことから出生時の感染が示唆された。

同様の症例は、ベルギーにおいても10日齢の下痢を呈する子牛に認められている⁴⁾。Catry Bら⁴⁾は、髄膜炎は既存の病気に併発して起こると述べており、本症例も直腸便からロタウイルスが検出され、下痢を併発していた可能性が考えられ、類似していた。

保菌状況調査の結果では、当該牛の母牛と同居牛に保菌が確認され、M.vが農場内で浸潤している可能性が示唆された。当該子牛の母牛は県外導入で初産であったこと、M.vが分離された農場の共通点は導入牛の割合が高かったことから、導入以前に感染した可能性も考えられた。管内の和牛繁殖農家の子牛におけるM.v保菌率は、非常に低い結果であった。しかし、今回親牛と子牛からM.vが分離され、水平感染の可能性も示唆されたので、今後は親牛の保菌状況調査も含めた更なる検討が必要と考えられた。

今回の症例は、当初、簡易同定キットでM.hと同定された。しかし、M.hは一般的に牛の呼吸器病原菌の一つであること、M.h.cは簡易同定キットによる同定は限界があること⁷⁾が知られているため、今回16SrRNAによる解析を行った。解析の結果から、M.vと判明し、M.h.cが疑われる症例では16SrRNAによる解析を併せて行う必要があると考えられた。

今後、症例を重ねて本菌の病原性、保菌状況、感染経路等についてさらに検討していく必要がある。

稿を終えるにあたり、16SrRNAの遺伝子配列解析及びM.vの免疫染色に協力していただいた(独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所の勝田賢先生、川島健司先生、

星野尾歌織先生、並びに保菌状況調査に協力していただいた畜主の皆さまに深謝いたします。

引用文献

- 1) Angen O, Mutters R, Caugant DA, et al.: Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16S rRNA sequencing with proposal of *Mannheimia haemolytica* gen. nov., comb. nov., *Mannheimia granulomatis* comb. nov., *Mannheimia glucosida* sp. nov., *Mannheimia ruminalis* sp. nov. and *Mannheimia varigena* sp. nov. Int J Syst Bacteriol 49 Pt 1:67-86 (1999).
- 2) Angen O, Ahrens P, Bisgaard M: Phenotypic and genotypic characterization of *Mannheimia*(*Pasteurella*) *haemolytica*-like strains isolated from diseased animals in Denmark. Vet Microbiol. Vet Microbiol 84:103-114 (2002).
- 3) Blackall PJ, Bisgaard M, Stephens CP: Phenotypic characterization of Australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*. Aust Vet J 80(1-2):87-91(2002).
- 4) Catry B, Opsomer G, Decostere A, et al.: Fatal meningitis in a calf caused by *Mannheimia varigena*. Vet Science 77:187-188 (2004).
- 5) Frank G: 1989, Pasteurellosis of cattle. In *Pasteurella* and Pasteurellosis, pp. Academic Press, London:197-222(1989).

- 6) 市川雅子, 山中健吾, 石本明宏, 荒木由希子: 滋賀県での *Mannheimia* 属菌分離陽性牛の細菌, ウイルス学のおよび病理組織学的調査. 獣医畜産新報 61(1):47-52 (2008).
- 7) 勝田賢, 河本麻里子, 川島健司, 三上修, 小野寺利幸, 庄司智太郎, 坪井孝益: *Mannheimia*属菌分離陽性牛の細菌, ウイルス学のおよび病理組織学的検査. 動衛研研究報告 115:15-18 (2009).
- 8) 又吉正直, 片桐慶人, 安富祖誠, 相澤真紀, 大城守, 津波修: *Mannheimia vari-gena*が分離された早産子牛の敗血症. 日本獣医師会雑誌 63:275-277 (2010).