

第 二 部

本島地域で初めて確認された流行性出血病ウイルス血清型 5

北部家畜保健衛生所
羽賀淳 伊佐健次
家畜衛生試験場
銘苅裕二 友知久幸

【はじめに】

流行性出血病ウイルス (EHDV) はレオウイルス科オルビウイルス属の10分節2本鎖RNAウイルスである。ヌカカなど節足動物が媒介するアルボウイルスであり、季節風によりヌカカとともに東アジアや東南アジアから国内に侵入すると考えられている。1、2、4~10 (9、10は暫定) の血清型に分けられ、国内では血清型2によるイバラキ病、血清型6によるイバラキ病様疾病、血清型7による流死産、発熱、嚥下障害などが報告されている。

流行性出血病ウイルス血清型5 (EHDV-5) は1977年にオーストラリアで初めて分離され、国内では2016年と2017年に沖縄県八重山地域で分離されている。また、2017年には八重山地域で異常産を呈した母牛と胎子から遺伝子が検出されており、異常産への関与が疑われている。

今回、管内の2農場で本島地域では初めてEHDV-5が確認されたので報告する(図1)。

流行性出血病ウイルス (EHDV)

分類:レオウイルス科オルビウイルス属/10分節2本鎖RNAウイルス
感染:ヌカカが媒介する(アルボウイルス)
疫学:季節風によりヌカカとともに東アジア、東南アジアから国内侵入
亜型:1、2、4~10の血清型(9、10は暫定)
病態:血清型2(イバラキ病)、血清型7(流死産、熱性疾患)等

流行性出血病ウイルス血清型5(EHDV-5)の確認例

年	場所	分離・遺伝子検出等
1977	オーストラリア	初分離
2016	八重山地域	日本初分離
2017	八重山地域	分離
	八重山地域	遺伝子検出(胎子)、異常産へ関与?

管内2農場において本島地域で初めてEHDV-5が確認されたので報告する

図1

【農場概要】

1例目は管内離島の母牛5頭、子牛2頭の肉用牛農場(A農場)で、2022年10月26日に出生した子牛に体形異常および起立不能が認められた。子牛は雌で左前肢の内転、斜頸が認められ、母牛は1歳、初産

で異常産ワクチンの接種歴はなかった(図2)。

農場概要:A農場(本島北部離島)

【農場】

畜種:肉用牛
飼養頭数:母牛5頭、子牛2頭

【経緯】

2022/10/26 予定日に出生したが体形に異常あり
2022/10/27 家保へ通報し、立ち入り

【当該子牛】

性別:雌
症状:左前肢内転、斜頸

【母牛】

年齢:1歳
産歴:初産
異常産ワクチン接種歴:なし



子牛

図2

2例目は管内の母牛16頭、子牛6頭の乳用牛農場(B農場)で2022年11月12日に畜主が流産を確認し(胎齢15日)胎子は冷凍保存された。同農場では同年11月7日にも流産が発生していた。母牛は5歳、2産目で異常産ワクチンの接種歴はなかった(図3)。

農場概要:B農場(本島北部)

【農場】

畜種:乳用牛
飼養頭数:母牛16頭、子牛6頭

【経緯】

2022/11/7 別の牛(同居牛1)で流産発生
2022/11/12 本事例の流産発生(胎齢215日)
胎子は冷凍保存。家保へ病歴依頼。

2022/11/14 家保立入

【当該母牛】

年齢:5歳
産歴:2産目
異常産ワクチン接種歴:なし



図3

【材料と方法】

両農場とも子牛の剖検を定法により実施し、臓器(脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓)を細菌学的検査、病理組織学的検査に供した。細菌学的検査は血液寒天培地を用い好気培養、CO₂培養、嫌気培養を行った。病理

組織学的検査は A 農場子牛を対象に行い、臓器と筋をホルマリン固定後 HE 染色し鏡検した。B 農場の胎子は冷凍保存されていたため実施しなかった (図)。

材料と方法1

農場	検査対象	剖検	病理	細菌	異常産関連ウイルス		
					抗体	遺伝子	分離
A 農場	子牛	実施	臓器・筋	臓器	血清	全血・臓器	全血・臓器
	母牛	-	-	-	血清	全血	全血
	同居牛	-	-	-	血清	全血	全血
B 農場	胎子	実施	-	臓器	-	臓器	臓器
	母牛	-	-	-	ペア血清	全血	全血
	同居牛	-	-	-	ペア血清	全血	全血

臓器: 脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓 - : 実施せず

剖検: 定法により実施、A農場子牛は鑑定殺
 病理組織学的検査: ホルマリン固定、HE染色
 細菌学的検査: 血液寒天培地、好気/CO2/嫌気培養

図4

ウイルス学的検査は抗体検査、遺伝子検査、ウイルス分離を行った。抗体検査は A 農場の子牛、母牛、同居牛 5 頭の血清、B 農場の母牛と同居牛 5 頭のペア血清を用い中和試験を実施した。

遺伝子検査は全血、臓器を用いアルポウイルス multiplex RT-PCR、BVDV RT-PCR、EHDV 特異的 RT-PCR、EHDV 血清型別 RT-PCR を実施した。ウイルス分離は全血、臓器を材料とし Hmlu 細胞を用いて実施した。加えて血清型別、分子系統解析を農研機構動物衛生研究部門に依頼した。

材料と方法2

抗体検査: 中和試験を実施

AKAV: アカバネウイルス EHDV-5: 流行性出血熱血清型5
 AINV: アイソウイルス PEAV: ビートンウイルス
 CHUV: チョウゼンウイルス SHAV: シヤモンダウイルス
 IBAV: イバラキウイルス BVDV: キウウイルス性下痢ウイルス

遺伝子検査: PCR検査を実施

アルポウイルス multiplex RT-PCR (Ohashi, S et al., 2004)
 BTV: ブルータンダウイルス SIMV: 田シンプウイルス群
 EHDV: 流行性出血熱ウイルス PALV: パリアムウイルス群

BVDV RT-PCR (Vileckatal, 1994)

EHDV RT-PCR (山本ら, 2017)

EHDV 血清型別 RT-PCR (Maan, S et al., 2007)

ウイルス分離: HmLu-1細胞に接種

血清型別、分子系統解析を農研機構動物衛生研究部門に依頼

図5

【検査成績】

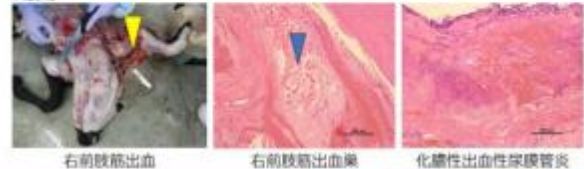
剖検では、A 農場子牛に筋の拘縮による頸部左側への斜頸、左前肢の内転、右前肢筋出血が見られたが B 農場子牛には凍結の影響が疑われる脳、肝臓、腎臓の軽度脆弱化を除き著変は認められなかった。病理組織学的検査では、A 農場子牛の右前肢筋に出血および好中球浸潤が認められたがウイルス感染による体型異常を疑う骨格筋低形成などの異常は見られ

なかった。細菌学的検査では、両農場の子牛から有意菌は分離されなかった (図)。

結果①剖検・病理・細菌

剖検	病理	細菌
A 農場 頸部左側への斜頸 左前肢の内転 右前肢筋出血	骨格筋低形成なし 右前肢筋に出血・好中球浸潤 化膿性出血性尿膜腎炎	有意菌分離なし
B 農場 脳、肝、腎やや臓器 (凍結融解の影響か?)	実施せず(冷凍保存)	有意菌分離なし

A農場



右前肢筋出血

右前肢筋出血

化膿性出血性尿膜腎炎

図6

抗体検査では、A 農場で EHDV-5 の抗体を 7 頭中 5 頭が保有していたが、他のウイルスの抗体も認められた。B 農場では EHDV-5 の抗体を全頭が保有し 1 頭には有意な抗体価の上昇 (4倍以上) が見られた (図7)。

結果②抗体検査(中和試験)

A農場	AKAV	AINV	CHUV	IBAV (EHDV-2)	EHDV-5	PEAV	SHAV	BVDV I	BVDV E
子牛	-	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
母牛	1株	<2	<2	<2	4	<2	<2	<2	<2
同居牛	1 4株	<2	<2	2	4	256±	<2	1024	64
同居牛	2 不明	8	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
同居牛	3 4株	8	4	<2	32	64	<2	<2	<2
同居牛	4 1株	<2	<2	<2	<2	16	2	<2	1024
同居牛	5 8株	4	2	16	<2	16	64	4096±	8

母牛・同居牛抗体保有、1頭は有意上昇

B農場	AKAV	AINV	CHUV	IBAV (EHDV-2)	EHDV-5	PEAV	SHAV	BVDV I	BVDV E
母牛	6株	2	4	<2	<2	<2	<2	<2	256 512
同居牛	2 2株	2	2	<2	128 128	8	4	64 32	16 16
同居牛	3 1株	4	2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
同居牛	4 1株	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
同居牛	5 8ヶ月	4	4	<2	<2	<2	<2	<2	<2
同居牛	6 7ヶ月	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2

図7

遺伝子検査では両農場の母牛と同居牛から EHDV の遺伝子が検出され、A 農場で 3 株 (母牛、同居牛 2 頭) B 農場で 2 株 (同居牛 2 頭) の計 5 株の EHDV-5 が分離、同定された。一方で、子牛からは両農場ともに抗体、遺伝子は検出されず、ウイルスも分離されなかった (図)。

結果③ウイルス学的検査

検査対象	齢	EHDV-5抗体検査		遺伝子検査				ウイルス分離	判定	
		Pre	Post	Arbo-Nucl	BVDV	EHDV	EHDV血清型			
子牛	0か月	<2	NT	-	-	NT	NT	-	-	
A農場 同居牛	母牛	1歳	4	NT	EHDV	-	+	5	分離	EHDV-5
	1	4歳	16	NT	EHDV	-	-	-	-	-
	2	不明	<2	NT	EHDV	-	+	5	分離	EHDV-5
	3	4歳	32	NT	EHDV	-	-	-	-	-
	4	1歳	16	NT	EHDV	-	+	-	-	-
5	8歳	<2	NT	EHDV	-	+	5	分離	EHDV-5	
B農場 同居牛	胎子	なし	NT	NT	-	-	-	-	-	-
	母牛	5歳	64	64	EHDV	-	+	-	-	-
	1	2歳	64	32	EHDV	-	+	5	分離	EHDV-5
	2	1歳	64	16	EHDV	-	+	-	-	-
	3	1歳	<2	8	EHDV	-	+	5	分離	EHDV-5
	4	8カ月	32	64	EHDV	-	+	-	-	-
5	7カ月	32	64	EHDV	-	+	-	-	-	

図8

分子系統解析は分離株 5 株を対象に実施した。血清型に関わるタンパク質をコードするゲノム第 2 分節 641bp の解析では B 農場同居牛 3 から分離された株の 1 塩基を除き配列はすべて一致し、過去にオーストラリアや八重山地域で分離された血清型 5 の株と同じクレードに含まれた(図)

分子系統解析(血清型)

最尤法によるゲノム分節2(外殻タンパク質をコード)の部分配列に基づく分子系統解析



図9

非構造蛋白をコードするゲノム第 3 分節 493 b の解析では分離株 5 株は同一の配列を持ち、東アジアでの分離株と近縁であった(図0)

分子系統解析(地理)

最尤法によるゲノム分節3(T2コアタンパク質をコード)の部分配列に基づく分子系統解析

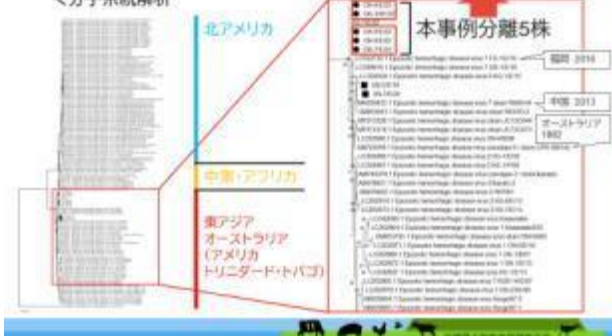


図10

以上の結果を受け追跡調査を実施した。材料は 2022 年 5 月～11 月に 1 農場につき 3 頭を基本に採血したおと井血清で EHDV-5 の中和試験を行い、前回の採血時と比較し 4 倍以上の抗体価上昇を有意と判定した。その結果、本島地域では 9 月に 1 件 1 頭、11 月に 4 件 7 頭で抗体価の有意上昇が認められた(図1)

追跡調査(おとり牛の抗体検査)

材料:2022年5～11月に採取したおとり牛血清
方法:EHDV-5の中和試験を実施
判定:4倍以上の抗体価上昇を有意と判定

抗体価有意上昇 農場数・頭数

	実施数/月	7月		9月		11月	
		件	頭	件	頭	件	頭
本島							
北部地域	5	15	0	0	3	6	
中南部地域	9	25	0	0	0	1	
宮古地域	5	15	0	0	0	0	
八重山地域	10	29	0	0	2	2	

図11

【考察】

これまで EHDV-5 は国内では八重山地域でのみ確認されており、今回はより北上した地域である本島地域で初めての確認となる。2 農場で分離された 5 株は同じ由来で過去の報告と同様に東アジア地域から侵入したと考えられる。追跡調査の結果から本島地域には 2022 年の 7～9 月に侵入したと考えられ、その後島内で伝播したのか 9～11 月に再度侵入したのかは明らかでない。今回発生した 2 例の異常産に EHDV-5 が関与したことを疑う結果は得られておらず、異常産の原因の特定には至っていない。

【まとめ】

今回、本島地域で初めて EHDV-5 が確認されたが、侵入の経緯や病原性は不明である。今後も EHDV-5 の浸潤状況をモニタリングするとともに、過去に異常産への関与が指摘されていることから EHDV-5 の病原性について知見を積み重ねる必要がある。

5 2018～2022年に沖縄県で流行が確認された多様なアルボウイルス

家畜衛生試験場

銘苅 裕二 友知 久幸

背景と目的】

アルボウイルスとは節足動物によって媒介され、脊椎動物に伝播されるウイルスの総称である。国内で発生したアルボウイルス関連の監視伝染病には、ヌカカによる媒介で牛に異常産を起こすアカバネ病やアイノウイルス感染症、チュウザン病、牛に熱性疾患や流産を起こすイバラキ病や牛流行熱、ブレータング、蚊による媒介で豚に異常産を起こす日本脳炎があげられ、これら疾病の流行は畜産物の生産性を低下させ、畜産農家の経済的損失を招く原因となる。本県はアルボウイルスの常在地であるアジア・オセアニアの熱帯・亜熱帯地域に近接し、また亜熱帯地域にも属するため吸血昆虫の活動が活発であり、ウイルスの侵入リスクや伝播リスクは非常に高い。過去にはアカバネ病や牛流行熱などの発生が確認され、近年ではブニップクリークウイルスや流行性出血病ウイルス血清型5(EHDV-5)など、これまで国内で確認されていないウイルスが本県で初めて分離確認されている。

今回、2018年から2022年のおとど牛調査や病性鑑定において多様なアルボウイルスの流行が確認されたのでその概要を報告する(図1)。



図1 アルボウイルスについて

【材料と方法】

1. おとど牛調査 2018～2022年の5、7、9、11月に沖縄本島や宮古・八重山地域で牛1,666頭から採取した洗浄血球と血漿を用いてウイルス分離を実施。また、浸潤状況やウイルス流行時期を推定するために同年同月に未越夏

牛を追跡採取した血清1,626検体を用いて各種アルボウイルス(牛流行熱(BEFV)、アカバネ(AKAV)、アイノ(AINV)、チュウザン(CHUV)、イバラキ(IBAV)、流行性出血病ウイルス血清型5(EHDV-5)、ピートン(PEAV)、シャモンダ(SHAV))の中和試験を実施。

2. 病性鑑定 2018～2022年度に113件(牛異常産や新生子牛の神経症状99件、発熱や起立不能、流涎等の症状14件)のアルボウイルス関連検査を実施。遺伝子検査は、胎子臓器や母牛・同居牛のEDTA血を用い、複数のアルボウイルスを検出するアルボウイルス Multiplex RT-PCR法や流行熱ウイルスを検出するBEFV RT-PCR法を実施。ウイルス分離は、胎子臓器や母牛・同居牛の洗浄血球と血漿を用いて実施。抗体検査は、胎子体液や母牛・同居牛の前後血清を用い、各種アルボウイルスの中和試験を実施(図)。

3. 遺伝子解析 近年、兵庫県や鹿児島県でイバラキ病様の嚥下障害を呈した牛からEHDV分離事例があり本県においてもおとど牛や病鑑材料から分離されたためEHDVについて実施。分離株3株のゲノム分節3およびゲノム分節2の部分塩基配列決定後、分子系統樹解析を実施(図)。

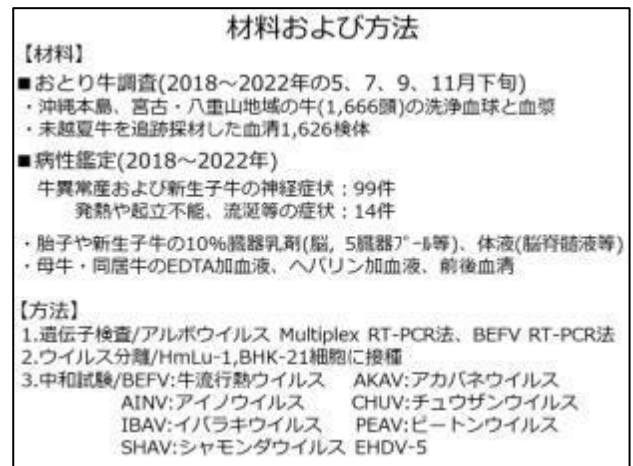


図2 おとど牛調査、病性鑑定 材料および方法

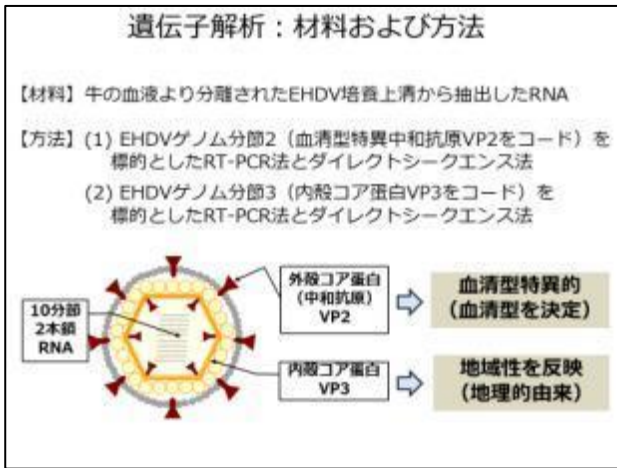


図3 遺伝子解析 材料および方法

【結果】

1. おとり牛調査 :6 種(AKAV、CHUV、デアギュラ(DAGV)、PEAV、EHDV、サシペリ(SATV))21 株のウイルスを分離(図4)。浸潤状況調査で2018年は3種(AKAV、AINV、IBAV)、2019年は5種(AKAV、CHUV、IBAV、SHAV、BEFV)、2020年は4種(AKAV、CHUV、IBAV、PEAV)、2021年は3種(AKAV、CHUV、EHDV-5)、2022年は5種(AKAV、AINV、CHUV、PEAV、EHDV-5)のウイルスにおける流行があり八重山地域の11月下旬採材時血清で抗体陽転が多かった(図5、6)。

遺伝子検査およびウイルス分離成績

採種年	採種月	種別	種名	ウイルス名	採種地	種別	種名	ウイルス名		
2018	7	牛血液	糸島市	血清分離	DAGV	2018	1	佐賀県	神埼郡	SHAV
2018	8	牛血液(肉用牛)	糸島市	血清分離	DAGV	2018	9	熊本県	糸島市	PEAV
2018	8	牛血液	糸島市	血清分離	DAGV	2018	9	熊本県	糸島市	DAGV
2018	8	牛血液	豊後市	血清分離	BEFV	2018	9	熊本県	糸島市	DAGV
2018	7	牛血液	豊後市	ハイブレード	BEFV	2018	9	熊本県	糸島市	CHUV
2018	7	牛血液	豊後市	ハイブレード	BEFV	2018	9	熊本県	糸島市	CHUV
2018	7	牛血液	豊後市	ハイブレード	BEFV	2018	11	熊本県	糸島市	CHUV
2018	7	牛血液(肉用牛)	糸島市	血清分離	EHDV-6	2018	11	熊本県	糸島市	EHDV-6
2018	8	牛血液	糸島市	ハイブレード	BEFV	2018	11	熊本県	糸島市	DAGV
2018	8	牛血液	糸島市	血清	AKAV	2018	11	熊本県	糸島市	CHUV
2018	9	牛血液(肉用牛)	糸島市	血清分離	DAGV	2018	11	佐賀県	糸島市	CHUV
2018	9	牛血液(肉用牛)	糸島市	血清分離	DAGV	2018	11	佐賀県	糸島市	SHAV
2018	9	牛血液	豊後市	血清	SHAV	2018	11	佐賀県	糸島市	SATV
2018	9	牛血液	豊後市	血清	SHAV	2018	11	佐賀県	糸島市	AKAV
2018	9	牛血液	豊後市	血清	SHAV	2018	11	佐賀県	糸島市	AKAV
2018	9	牛血液	豊後市	血清	SHAV	2018	11	佐賀県	糸島市	EHDV-5
2018	9	牛血液	豊後市	血清	SHAV	2018	11	佐賀県	糸島市	EHDV-5
2018	9	牛血液	豊後市	血清	SHAV	2018	11	佐賀県	糸島市	CHUV

○:遺伝子検査陽性・ウイルス分離陰性
 ●:遺伝子検査陽性・ウイルス分離陽性

おとり牛調査
 ・6種21株を分離
 病性鑑定
 ・与那国島で発熱を呈した牛からBEFV遺伝子検出、ウイルス分離→牛流行熱
 ・牛異常産の病畜材料よりSHAV及びEHDV遺伝子検出→確定診断には至らず

図4 遺伝子検査およびウイルス分離成績

2. 病性鑑定 2019年の4件(発熱 起立不能)は、発症牛血液からBEFV 遺伝子の検出および BEFV 抗体価の有意上昇があり 牛流行熱と診断。牛異常産における胎子材料からSHAV 遺伝子を検出した事例や母牛 同居牛血液からEHDV 遺伝子を検出した事例はあるが、確定診断には至っていない(図4)。その他の病性鑑定でアルボウイルスの関与は無かった。



図5 アルボウイルス浸潤状況



図6 ウイルス流行時期の推定

3. 遺伝子解析 :分離株は東アジア・オーストラリア地域由来のクレードに属し、2019、2020年の分離株はEHDV-6、2022年の分離株はEHDV-5と同定された。また、分離されたEHDV-6およびEHDV-5はそれぞれ2015年兵庫分離株、2022年鹿児島分離株と近縁だった(図7、8)。

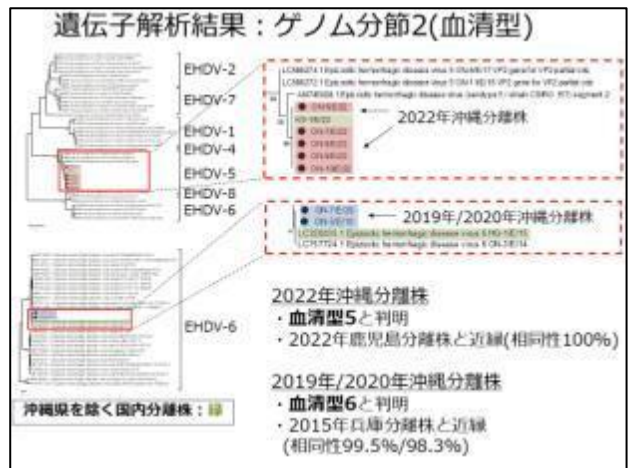


図7 遺伝子解析結果 :ゲノム分節2(血清型)

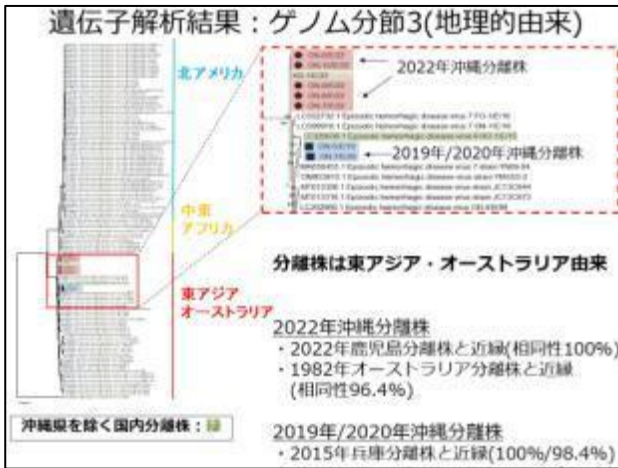


図 8 遺伝子解析結果 :ゲノム分節3(地理的要因)

考察

- 本県は他地域に比べウイルスが頻りに流行するため、母牛において感染抗体を保有することが疾病発生率の低下に寄与すると推察される。
- 同血清群間のウイルスが数種流行していることも判明しているため、遺伝子再集合等による変異株の出現が危惧される。
- 今後も国内疾病侵入リスクを測る上でもアルポウイルスに対する監視体制の維持が必要である。

図 10 考察

【まとめと考察】

2018～2022年度のおと井から6種21株のアルポウイルスが分離されたがいずれも不顕性感染であり、浸潤状況調査より毎年多様なウイルスが流行し、10月から11月上旬に八重山地域で感染が多い傾向にあった。また、病性鑑定でアルポウイルス感染症と診断したのは BEFV が関与した牛流行熱のみだった。今回、おと井や病性鑑定材料より EHDV が分離され、遺伝子解析の結果、他県においてイバラキ病様の症状を呈した牛から分離された株と近縁だったが、感染牛は無症状であった。

本県は他地域に比べウイルスが頻りに流行するため母牛において抗体を保有することが疾病発生率の低下に寄与すると推察される。また、SHAV や SATV のような同血清群間のウイルスが数種流行しているため、遺伝子再集合による変異株の出現が危惧される。今後も国内疾病侵入リスクを測る上でもアルポウイルスに対する監視体制の維持が必要であると考えられる。

まとめ

おと井のウイルス分離
2018～2022年度までに6種類21株のアルポウイルスを分離したが、いずれも不顕性感染であった。

病性鑑定
アルポウイルス感染症として診断したのは BEFV が関与した牛流行熱のみであった。

分離された EHDV の遺伝子解析
他県においてイバラキ病様の症状を呈した牛から分離された株と非常に近縁だったが、感染牛は無症状であった。

浸潤状況調査およびウイルス流行時期の推定
県内に多様なアルポウイルスの侵入を確認し、10～11月上旬の八重山地域で感染が多い傾向にある。

図 9 まとめ

6. 真菌の関与が疑われた牛異常産事例

家畜衛生試験場

仲村望 長濱克徳

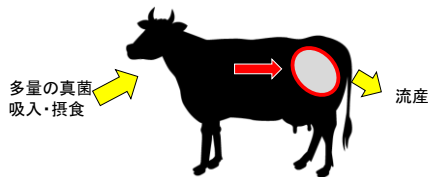
中央家畜保健衛生所

桃原紀子

【はじめに】

牛の真菌性流産は多量の真菌を吸入、摂食することにより感染し、血行を介して胎盤に病巣を形成することで流産が起きると考えられている。複数ある病原真菌のうち、特にアスペルギルス属によって引き起こされるケースが多いとされる(図1)。今回、体表に複数の痂皮が形成された牛の流産胎子について、真菌症と診断し、病変部からフザリウム属菌が分離されたため、その概要を報告する。

牛の真菌性流産



- *Aspergillus*属、*Rhizopus*属、*Mucor*属、*Candida*属など。
- 牛の真菌性流産事例の60%以上が*A. fumigatus* (Kundtson et al., J Vet Diagn Invest. 1992)
- 流産胎子で病変が認められる場合がある。(Pal M et al., Indian Council of Agricultural Research. 2007)
例：皮膚の隆起(頭部と頸部)、肺炎

図1 牛の真菌性流産

【発生概要】

令和5年7月、本島中部の黒毛和種繁殖農場(母牛12頭、育成牛5頭、子牛2頭飼養)で、初産牛1頭が胎齢218日で流産し、胎子が死亡したため病性鑑定を実施した。当該母牛に異常は認められなかった(図2)。同居牛では下痢や皮膚真菌症の個体が認められた。また、飲水消毒は実施しておらず、飼養衛生管理指導のため環境検査も追加で実施した(図3)。えさは自家産の粗飼料と配合飼料を給与しており、ビタ~~ミ~~などの添加剤は与えていなかった。

発生概要



- 令和5年7月、初産牛1頭が流産(胎齢218日)
- 当該母牛は異常なし。
- 異常産3種混合不活化ワクチンは接種済み。



- 無毛、無歯
- 哺乳意欲あるも予後不良と判断 → 翌日死亡。

↓
病性鑑定

図2 発生概要

同居牛、飼養環境



- 同居牛で下痢、皮膚病(ダニ、真菌)
- 水はげが悪い。
- 飲水(農業用水)消毒未実施。

↓
環境検査(追加調査)

図3 同居牛、飼養環境

【材料と方法】

流産胎子1頭、母牛腔スワブ、母牛及び同居牛5頭の血液、飲水及び飼料を検査に供した。剖検、病理組織検査、真菌検査、細菌検査、ウイルス検査、環境検査を実施した(図4~8)。

材料と方法

1. 剖検

材料：流産胎子 1頭
方法：定法に従い実施

2. 病理組織検査

材料：主要6臓器（脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓）、痂皮、胸腺、

第四胃、空腸、眼

方法： 1) HE染色
2) 特殊染色：PAS染色、グロコット染色
3) 免疫組織学的染色：抗*Aspergillus*抗体
抗*Rhizopus arrhizus*抗体

図4 材料と方法 (剖検、病理組織検査)

材料と方法

3. 真菌検査

材料：主要6臓器、痂皮、胃内容物、脳脊髄液、血液、飲水、飼料

方法： クロラムフェニコール加PDA寒天培地で直接培養
(37°C・好気・1週間～1カ月)

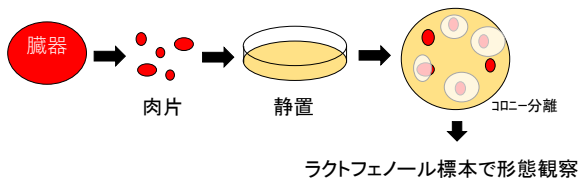


図5 材料と方法 (真菌検査)

材料と方法

4. 細菌検査

材料：主要6臓器、痂皮、胃・小腸内容物、脳脊髄液、血清、血液、膣スワブ

方法： 1) 一般細菌検査
5%羊血液寒天培地
DHL寒天培地
スキロー寒天培地
2) ブルセラ症検査
選択・非選択培地
抗体検査 (牛ブルセラ症エライザキット)
3) レプトスピラ遺伝子検査 (*flaB*遺伝子)

図6 材料と方法 (細菌検査)

材料と方法

5. ウイルス検査

材料：大脳、5臓器プール、血液 (EDTAまたはヘパリン加)、血清

方法：

1) 遺伝子検査
- アルボウイルス
Simbu血清群 (AKAV, AINOV, PEAV等)、
Palyam群 (CHUV等)、EHDV群 (IBAV等)、BTV
- 牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV)
2) 抗体検査 [pre, post]
- アルボウイルス、BVD (I・II)
3) ウイルス分離

図7 材料と方法 (ウイルス検査)

材料と方法

6. 環境検査 (追加調査)

材料：飲水 (5か所)、飼料 (4つ)

方法：

1) 一般細菌検査
5%羊血液寒天培地
普通寒天培地 (定量)
2) 真菌検査

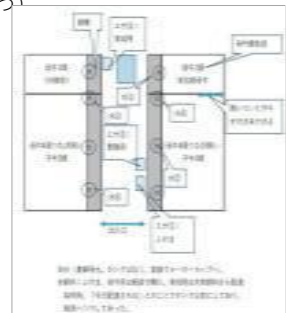


図8 材料と方法 (環境検査)

【結果】

剖検所見で胎子の右側肩部から大腿部にかけて大小様々な灰白色痂皮を認めた (図9-1)。臓器所見では心室に肉芽腫、肺に血腫、肝臓腫大、腎臓充血、胃粘膜充血、大脳硬膜下出血、眼球白濁が認められた (図9-2~9-5)。病理組織検査では、真菌を伴う表皮、真皮及び胸腺の壊死、肝臓の血管炎、第四胃粘膜壊死が認められた (図10-1~10-4)。皮膚及び胸腺の抗*Aspergillus*属抗体による免疫染色は陰性であった (図11)。真菌検査では、痂皮、肺、肝臓及び胃内容物から有隔壁菌糸で三日月状分生子を持つ *Fusarium* 属菌が分離され、腎臓から無隔壁菌糸の接合菌が分離された (図12)。細菌検査では、心臓、肝臓、脾臓及び腎臓からピブリヤ属菌が分離された (図13)。母牛及び胎子の異常産関連ウイルスの遺伝子検査、抗体検査及び分離は全て陰性であった (図4)。環境材料からは胎子で分離された真菌と特徴の似た真菌は分離されなかった。また、飲水中の一般細菌数は 10^5 個/ml 以上であった (図5)。

結果：1.剖検（体表）



図 9-1 剖検所見 (体表)

結果：1.剖検

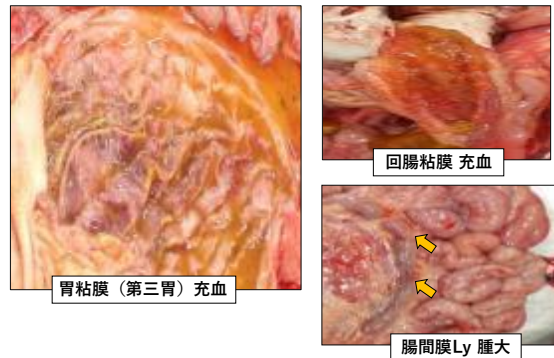


図 9-4 剖検所見 (消化管)

結果：1.剖検（心臓・肺）

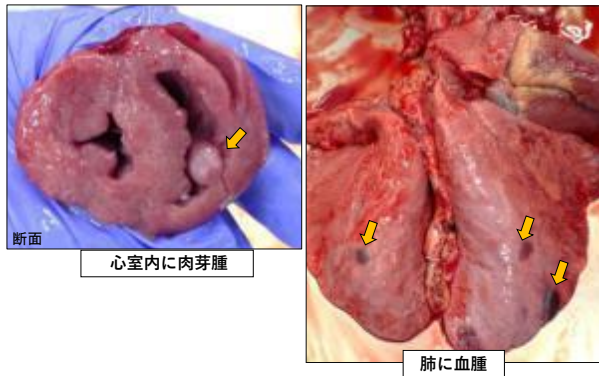


図 9-2 剖検所見 (心臓 肺)

結果：1.剖検（大脳・眼球）

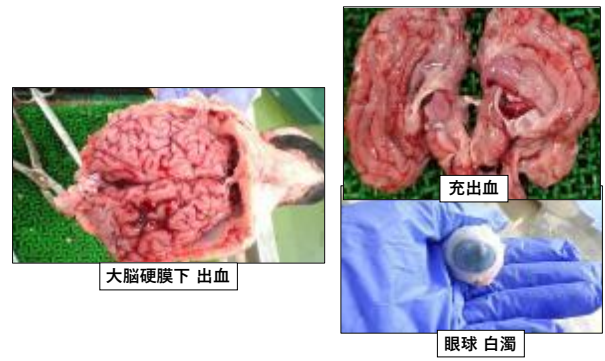


図 9-5 剖検所見 (大脳 眼球)

結果：1.剖検（肝臓・腎臓）

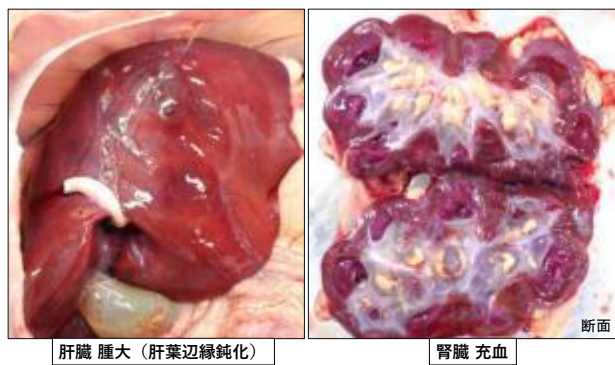


図 9-3 剖検所見 (肝臓 腎臓)

結果：2.病理組織検査（皮膚）

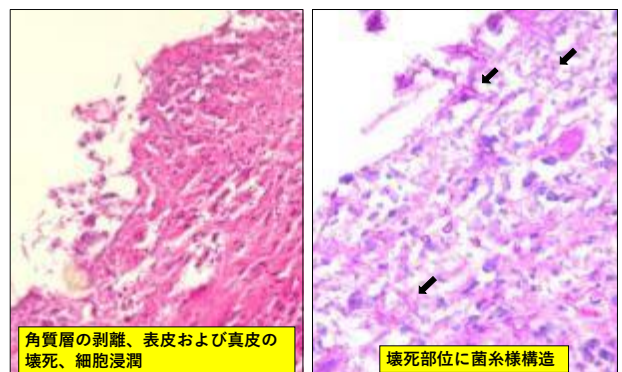


図 10-1 病理組織検査結果 (皮膚)

結果：2. 病理組織検査（胸腺）

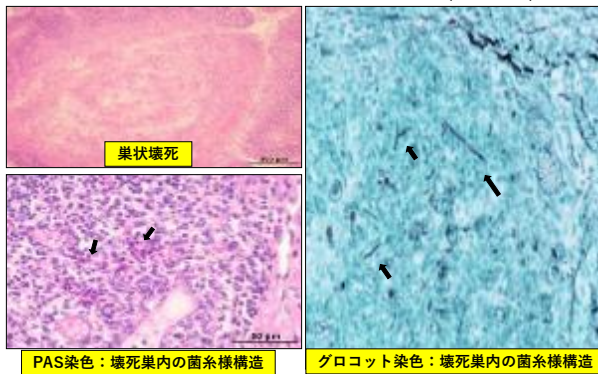


図 10-2 病理組織検査結果 (胸腺)

結果：2. 病理組織検査（胸腺）

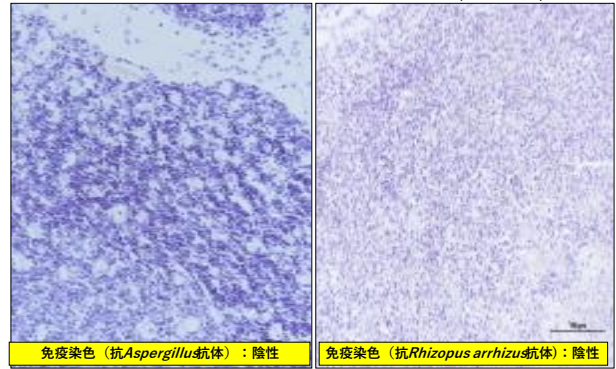


図 11 病理組織検査結果 (免疫染色)

結果：2. 病理組織検査（肺・肝臓）

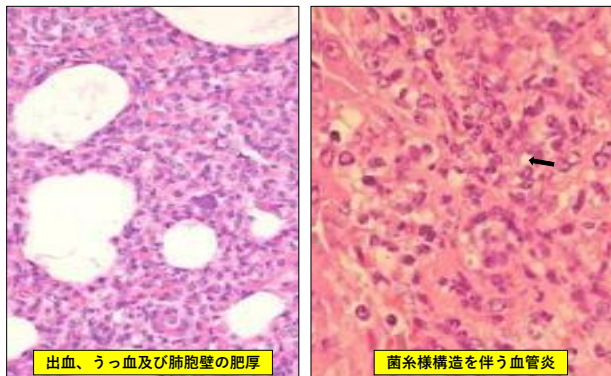


図 10-3 病理組織検査結果 (肺 肝臓)

結果：3. 真菌検査

材料	集落	形態	菌種
肺 肝臓 胃内容 皮膚（痂皮）	・厚みのある白色綿毛状集落 ・発育速度は早く（24時間）、3日でシャーレ全面に波紋状に広がる。 ・培地裏面はクリーム色（1ヶ月以上経過しても色調変化なし。）	有隔壁菌糸で、幅は太く不均一。分生子は三日月形。その他厚膜胞子あり。	<i>Fusarium</i> 属
腎臓	灰白色綿毛状集落	無隔壁菌糸。胞子のうは球状	接合菌
単離培養	肺 肝臓		
腎臓	胃内容 皮膚		

図 12 真菌検査結果

結果：2. 病理組織検査（第四胃）

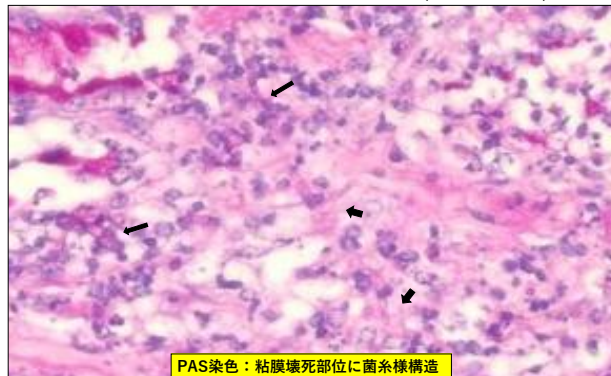


図 10-4 病理組織検査結果 (第4胃)

結果：4. 細菌検査

- 1) 一般細菌検査
 - ・カンピロバクター、サルモネラ、大腸菌 分離陰性
 - ・*Vibrio parahaemolyticus* 分離（心、肝、脾、腎：7⁺ 20NE）
 - ・*Citrobacter youngae* 分離（胃・腸内容：7⁺ 20E）
- 2) ブルセラ症検査：陰性
- 3) レプトスピラ遺伝子検査：陰性

図 13 細菌検査結果

結果：5. ウイルス検査

1) 遺伝子検査

アルボウイルス：BTV陽性（同居牛No.2-6）
BVDV：陰性

2) 抗体検査：抗体価の有意上昇なし。

3) ウイルス分離：陰性

図 14 ウイルス検査結果

結果：6. 環境検査

一般細菌検査		真菌検査		
採材場所	定量	色調	検出菌	検出菌種
水 ①	3 × 10 ⁵ 個/ml	茶色	Brevundimonas属菌（環境菌の一種）、Moraxella(Branhamella)上気道等の常在菌	Aspergillus属 (A. niger)
水 ②	4 × 10 ⁵ 個/ml	透明	Acetomonas salmonicida ssp. salmonicida、Moraxella(Branhamella)2	融合菌
水 ③	2 × 10 ⁵ 個/ml	透明	Sphingomonas属菌（環境菌の一種）の可能性	Wallemia属
水 ④	5 × 10 ⁵ 個/ml	透明	G(+)-球桿菌	子のう菌類、不完全菌類
水 ⑤	2 × 10 ⁵ 個/ml	透明	Capnocytophaga1（口腔内常在菌）、Chryseobacterium属（環境菌）他	Fusarium属（赤褐色）
飼料 乾燥	NT	NT	NT	融合菌
飼料 育陰	NT	NT	NT	子のう菌類、不完全菌類
飼料 必ず	NT	変色等なし	NT	Aspergillus属
飼料	NT	NT	NT	Aspergillus属 (A. niger)
母牛膈スワブ	NT	NT	G(+)-球菌	分離陰性

（参考）水濁法に基づく水質基準項目と基準値
一般細菌：1mlの検水で形成されるコロニーが100以下
大腸菌：検出されないこと

- ・ 飲水中から1 × 10⁵ 以上の菌検出
- ・ 下痢等の病原細菌の分離陰性
- ・ Aspergillus属ほか様々な真菌分離

図 15 環境検査結果

【まとめと考察】

体表及び全身諸臓器に異常が見られ、病変部から *Fusarium* 属菌が有意に分離された。免疫染色により *Aspergillus* 属菌は否定されたことから、病変形成には *Fusarium* 属菌が関与したと推察され、本症例は真菌症と診断した（図16）。*Fusarium* 属菌は環境中に広く存在し、生体側の免疫力低下によって日和見感染する。家畜ではマイコトキシンによる健康障害が問題であり、一部病原性を示す種が感染して表在部に病巣を形成する場合もあるが、深在性の真菌症となることはまれである。一方、人では免疫不全患者における深在性真菌症で分離されており、血管侵襲性が強く、肺感染から血行性に皮膚へと散布し、皮膚病変と菌血症をきたす頻度がアスペルギルス症より高いと言われている（図 17）。真菌を伴う血管炎を認めたことから、胎盤を通じて血行性に胎子に感染し、血行性に皮膚や内臓に播種したと推察された（図18）。流産の原因については、各種病原細菌、アルボウイルス及び BVD ウイルスの関与は否定的であり、総合的な結果から真菌の関与が疑われた（図19）。今回分離された *Fusarium* 属菌について、発育速度や厚膜胞子の有無などから *F. nivale*

の可能性は低い。集落の特徴だけでは同定困難のため、分子生物学的解析による菌種同定を検討中である（図20）。対策として、同居牛で下痢や皮膚炎、真菌関与を疑う流産が見られたことから、群として免疫力が低下し、日和見感染が起きやすくなっている可能性が考えられたため、粗飼料や配合飼料だけでなく、ビタミンなどの添加剤の投与、牛房やウォーターカップのこまめな清掃消毒、飲水消毒を実施するなどの飼養衛生対策が必要である。また、アルボウイルスの侵入が見られたことから、引き続き異常産ワクチン接種の継続と吸血昆虫対策（農場周辺の草を刈る、ハエ駆除など）を実施する必要がある（図 21）。

考察

■ 流産胎子

- ・ 皮膚及び複数の臓器病変部より *Fusarium* 属菌分離
- ・ 真菌を伴う病変
- ・ 抗 *Aspergillus* 抗体、抗 *Rhizopus arrhizus* 抗体に反応しない

病変形成に *Fusarium* 属菌が関与

診断名：真菌症

図 16 考察 流産胎子

考察

■ *Fusarium* 属について

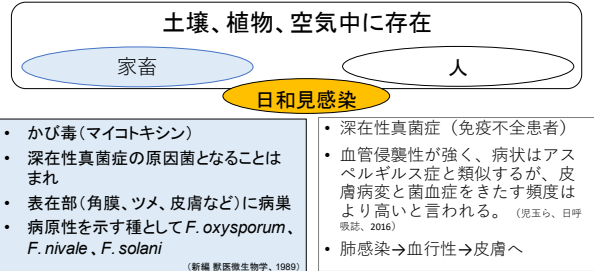


図 17 *Fusarium* 属について

考察

■胎子への感染経路



図 18 考察 感染経路

考察

■対策

- 飼養衛生管理対策
- 吸血昆虫対策

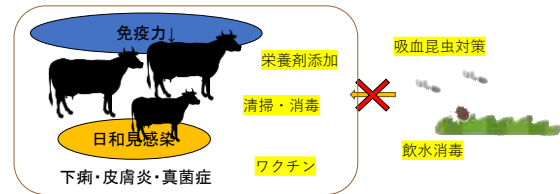


図 21 対策

考察

■流産の原因

- ・異常産関連ウイルス及び細菌検査結果は陰性
- ・ビブリオ属菌の病変形成への関与(？)
- ・胎盤病変は不明だが、胎子は真菌症

↓
真菌の関与を疑う

図 19 考察 流産の原因

考察

■分離されたFusarium属について

	分離菌	<i>F. oxysporum</i>	<i>F. nivale</i>	<i>F. solani</i>
PDA培地上での発育速度	速い	速い	遅い	速い
集落の特徴	綿毛状	フェルト状～綿毛状	やや縮毛状	粗密な縮毛状
色調	白 (裏面は白～クリーム)	白→ピンク、紫など多様 (裏面は無色、ピンク、紫など)	白→褐色	灰白～帯青～淡褐色 (裏面は色素産生を認める場合もある)
発育温度	37°C	5～40°C	5～37°C	25°C～35°C
厚膜胞子	+	+	-	+

- ・集落の特徴だけでは同定困難
- ・分子生物学的解析による同定を検討

図 20 考察 分離された *Fusarium* 属菌について

7. 県外牛導入後に発生した牛マンヘミア症

家畜衛生試験場
長濱克徳 仲村望 ほか
中央家畜保健衛生所
荒木美穂

【はじめに】*Mannheimia haemolytica*(Mh)は、反芻動物の上部気道に常在し、牛パストレラ(マンヘミア)症の原因菌の一つである。症状は、発熱、粘液性鼻汁の漏出、流涙、発咳、呼吸促進を呈する。長距離輸送、過密飼育、急激な温度変化などストレス感作による発症やウイルス感染、マイコプラズマ感染に続発し、また、細菌の二次感染、三次感染によって重篤な肺炎を引き起こすとされる。我が国で分離されるMhは、血清型1型が主とされているが、近年、血清型6型が増加傾向である。今回、乳用牛農家で、県外牛導入後に血清型6型によるマンヘミア症が発生したので概要を報告する。

【発生概要】母牛48頭、育成牛4頭を飼養する酪農場で、2022年12月9日に県外から4頭導入した。発症牛はすべて自家産成牛で、ワクチンは接種していなかった。12月18日に成牛1頭が食欲不振となり23日には複数頭が発熱、食欲不振、呼吸器症状、鼻汁の漏出を呈した。26日には3頭死亡、他16頭が発症した。初発は、導入牛と自家産育成牛を飼養しているパドックと隣接している成牛舎の成牛で、その後、成牛舎で感染拡大した。

【材料及び方法】

材料は死亡牛の脳、心、肺、肝、腎、脾、胸水およびホルマリソ臓器、発症牛10頭の血液・鼻腔スワブを用いた。材料等を用いて臨床検査、血液検査、細菌学的検査(分離培養、薬剤感受性試験、遺伝子検査)、ウイルス学的検査(遺伝子検査)、前後血清による抗体検査(細菌、ウイルス)、病理組織学的検査(HE染色、免疫組織化学的染色)を実施した。

【体温および血液検査】

発症牛10頭中6頭で発熱、7頭で白血球数の高値、3頭でヘモグロビン値の低値を示した(図)。

体温および血液検査

No.	年齢	体温(℃)	WBC x10 ³ /μl	RBC x10 ⁶ /μl	HGB g/dl	HCT %	PLT x10 ³ /μl	発症月日
1	3.2	40.8	203	681	8.8	29.4	11.8	12月18日
2	5.9	40.8	133	543	7.9	26.3	39.8	12月23日
3	4.2	39.9	168	752	9.8	33.6	29.7	12月23日
4	3.0	39.5	136	549	7.7	26.7	35.4	12月24日
5	4.2	39.5	115	574	7.6	26.4	29.4	12月24日
6	4.0	38.6	111	628	9.1	30.8	27.6	12月24日
7	4.0	38.9	143	729	10.5	35.3	29.8	12月26日
8	3.9	40.0	156	672	9.7	31.6	22.2	12月26日
9	5.9	37.5	92	668	10.3	35.3	22.9	12月26日
10	6.0	36.4	181	815	11.4	37.4	19.5	12月26日
基準値		37.8~39.2	40~120	500~1000	8~15	24~46	10~80	

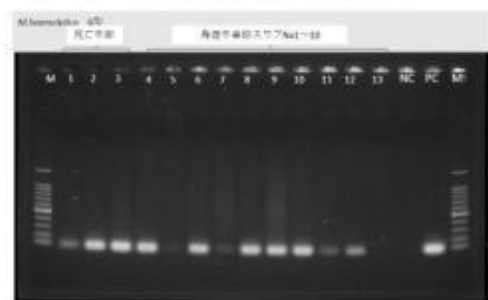
図1

【細菌学的検査】分離培養では、死亡牛の脳、心、肺、胸水および発症牛の鼻腔スワブ2検体からMhが分離された。薬剤感受性試験では、ABPC、AMPC、CEZ、CTF、GM、OTC、CL、ERFXに感受性、KMに中間、SM、EM、DOXYに耐性であった。12月26日以降、KMによる治療で収束している。遺伝子検査では、死亡牛肺および鼻腔スワブ9検体でMh6型陽性、鼻腔スワブ1検体で*Mycoplasma dispar*であった(図2)。

細菌検査2

・遺伝子検査

- Mh6型：死亡牛肺、鼻腔スワブ9検体陽性



- *Mycoplasma dispar*：鼻腔スワブ1検体陽性

図2

【ウイルス学的検査】死亡牛の肺および発症牛の鼻腔スワブを用いて牛アデノウイルス、牛コロナウイルス、牛ヘルペスウイルス1型、牛トロウイルス、牛ウイルス性下痢ウイルス、流行性出血病ウイルス、D型インフルエンザウイル

ス、牛パラインフルエンザウイルス3型、牛RSウイルスについて遺伝子検査を行ったがすべて陰性であった。

【抗体検査】2022年12月26日、2023年1月24日に採血した前後血清を用いた抗体検査では、BVDV2型が発症牛1頭有意上昇、RSウイルスが発症牛1頭有意上昇、Mhが発症牛9頭有意上昇、発症牛1頭高値、*Pasteurella multocida* (Pm)が発症牛2頭で有意上昇、*Histophilus somni* (Hs)が発症牛4頭で有意上昇がみられた(図4)。

抗体検査

No.	種別	IBR		BVD1		BVD2		RS		PI3	
		pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
		2022/12/26	2023/1/24								
No.1	自家産・発症	<2	<2	<2	<2	<2	4	64	128	64	4
No.2	自家産・発症	<2	<2	16	16	1024	2048	128	512	64	32
No.3	自家産・発症	<2	<2	<2	<2	<2	<2	16	32	16	16
No.4	自家産・発症	<2	<2	<2	<2	<2	<2	4	8	16	8
No.5	自家産・発症	<2	<2	<2	<2	<2	<2	16	8	16	8
No.6	自家産・発症	<2	<2	<2	<2	<2	<2	32	32	16	8
No.7	自家産・発症	<2	<2	<2	<2	<2	<2	512	128	256	256
No.8	自家産・発症	<2	<2	<2	<2	<2	<2	4	2	64	32
No.9	自家産・発症	<2	<2	64	32	84096	84096	1024	512	64	32
No.10	自家産・発症	<2	<2	4	8	1024	1024	256	128	32	16
No.11	購入牛・未発症	NT	256	NT	128	NT	128	NT	16	NT	64
No.12	購入牛・未発症	NT	32	NT	128	NT	512	NT	16	NT	128

図3

抗体検査

No.	種別	AD7		Mh		Pm		Hs		Hs 判定	
		pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
		2022/12/26	2023/1/28								
No.1	自家産・発症	128	4	1600	83200	400	800	0.36	0.89	-	+
No.2	自家産・発症	64	16	200	1600	100	<100	0.35	0.59	-	+
No.3	自家産・発症	32	<2	100	83200	100	800	0.2	0.82	-	+
No.4	自家産・発症	64	<2	400	83200	800	800	0.35	0.93	-	+
No.5	自家産・発症	32	2	200	83200	200	400	0.21	0.6	-	±
No.6	自家産・発症	64	4	100	83200	200	400	0.14	0.36	-	-
No.7	自家産・発症	8	8	200	1600	100	200	0.33	0.38	-	-
No.8	自家産・発症	16	<2	400	1600	400	800	0.23	0.49	-	+
No.9	自家産・発症	32	16	<100	83200	100	400	0.18	0.8	-	+
No.10	自家産・発症	64	64	200	83200	100	200	0.14	0.38	-	-
No.11	購入牛・未発症	NT	8	NT	200	NT	100	NT	0.1	-	-
No.12	購入牛・未発症	NT	2	NT	800	NT	400	NT	0.29	-	-

図4

【解剖所見】胸腔には褐色胸水が貯留し、肺は全ての葉で出血がみられた。肝変化した肺では、小葉間結合組織が拡張していた。肺中葉は、出血し、硬結していた(図5)。

解剖所見

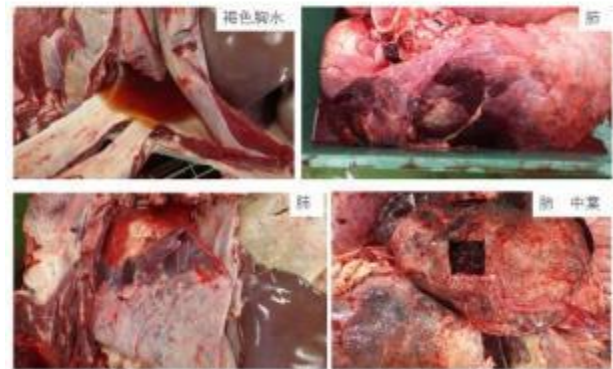


図5

【病理組織検査】肺は、出血し、漿膜、小葉間結合組織は肥厚していた。肺胸腔内には漿液の浸出、線維素の析出がみられた。肺胸腔内に炎症細胞が浸潤している部位では、好中球が変性した燕麦様細胞がみられ(図7)、出血性壊死性胸膜肺炎と診断された。

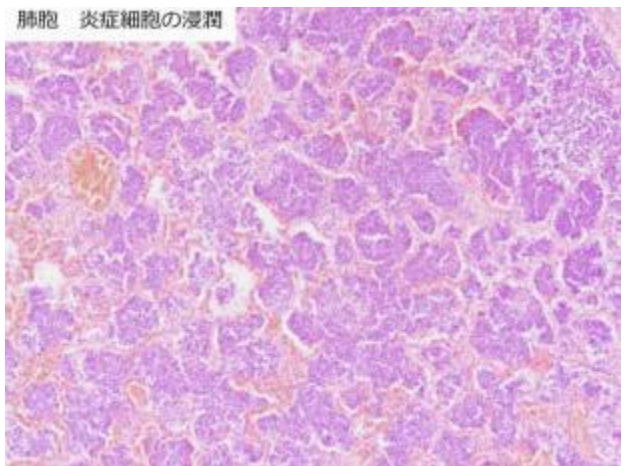
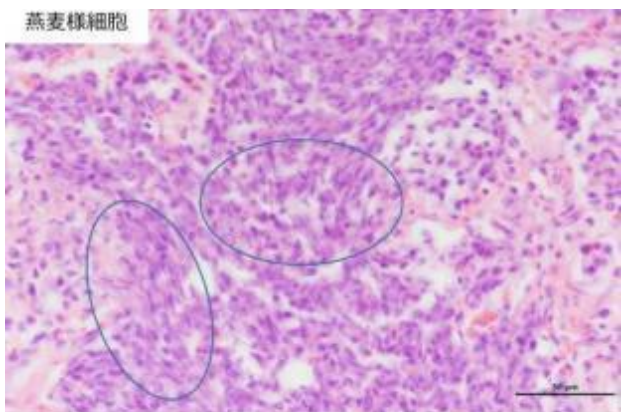


図6



組織診断名：出血性壊死性胸膜肺炎

図7

また、肺組織のグラム染色では炎症部位など広範にグラム陰性短桿菌が多数観察され、Mh血清型6型を標的とした免疫組織化学的染色では、炎症細胞や細菌塊に一

致して陽性を示した(図 8,9)。

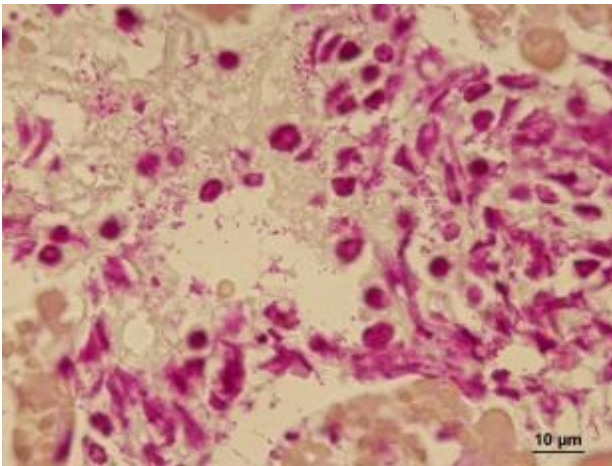


図 8

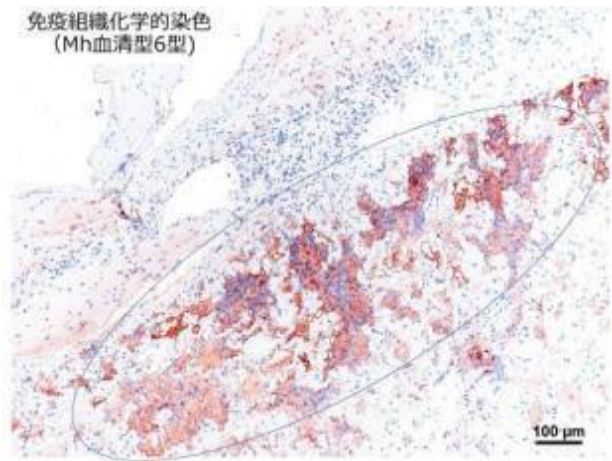


図 9

【まとめと考察】今回、県外牛導入後に牛マンヘミア症が発生し、3 頭死亡、16 頭発症となった。発生状況から県外導入牛から感染したと推察された。死亡牛の肺および鼻腔スワブ 9 検体で Mh6 型の遺伝子が検出、病理組織学的検査では燕麦様細胞を伴う出血性壊死性胸膜肺炎がみられ、Mh 血清型 6 型を標的とした免疫組織化学的染色では、炎症細胞や細菌塊に一致して陽性、Mh6 型によるマンヘミア症と同定された。抗体検査では、Mh が発症牛 9 頭、BVDV2 型、RSV が各 1 頭、*Pasteurella multocida* が 2 頭、*Histophilus somni* が 4 頭有意上昇した。今回の症例では、細菌分離や PCR 検査で他のウイルスや細菌の感染を示唆する結果を得られなかったが、抗体検査によって、混合感染が推測された。成牛の短期間の感染拡大、重篤化した同様の症例について、調査が必要である。

8. 突然死を呈した黒毛和種子牛から Clostridium perfringens D 型及び F 毒素型を分離した 1例

中央家畜保健衛生所
木村恵理子 照屋陽子 桃原紀子
家畜衛生試験場
長濱克徳

【はじめに】

Clostridium perfringens は、グラム陽性偏性嫌気性の芽胞桿菌である。本菌は腸内細菌叢の重要な構成菌であるとともに土壌や河川、海底の泥など環境中にも広く分布している。菌が持つ毒素遺伝子の組み合わせにより A 型から G 型の 7 種類に型別されている。日本で報告された牛の *C. perfringens* 感染症の症例報告は A 型によるもので、小腸に壊死や出血などの病変を形成し、毒素による中毒状態に陥ると腸管に加えて出血性の病変が全身の臓器で見られるようになり、いわゆるエンテロキセミアの病態で突然死を起こしていることが知られている。今回突然死をした子牛から D 型および F 毒素型の *C. perfringens* を分離したので報告する。

【発生概要】

発生地域は本島南部で、母牛 10 頭、育成牛及び子牛 7 頭を飼養する黒毛和種繁殖農場であり、飼料は自家生産の青草、乾草を与えていたが、一週間前より青草のみを給与に変更していた。また、濃厚飼料は購入飼料であった。飼料添加物はビタミン・カルシウム製剤で飲料水には水道水を与えていた。飼養者より令和 5 年 4 月、前日夕方まで元気に走り回っていた子牛が朝突然死んでいた、とのこと。家保に通報が入り農場に立ち入り、当該子牛は生後 19 日齢の、で給餌は母乳のみであり、何らかの疾病への罹患歴、治療歴はなかった。母牛は蹄葉炎に罹患していたが、治療に使用していた抗生剤の情報は得られなかった。

【材料及び方法】

定法に従い病理解剖を行い、組織をホルマリン固定後組織学的検査を実施した。細菌検査は主要 6 臓器を定法通りに培養、小腸内容物を血液寒天培地と、卵黄・カナマイシン加 CW 寒天培地にて培養し、コロニー性状と Api キットにて同定、定量培養を行った。クロストリジウム属菌が疑われた株に対しては、PCR で毒素型別とディスク拡散

法にて薬剤感受性試験を実施し、小腸内容物は DHL 寒天培地にて定量培養も行った。追加検査として同居牛の直腸便と農場内ふき取り隣接する牧草地の土を用い培養同定を行なった。

【病理解剖結果】

病理解剖にて、十二指腸から直腸までの腸管全域が赤黒く変色し、ガスが貯留し、赤色腹水もみとめられた。その他諸臓器に著変は認められなかった (図 1)。

結果：病理解剖



図 1

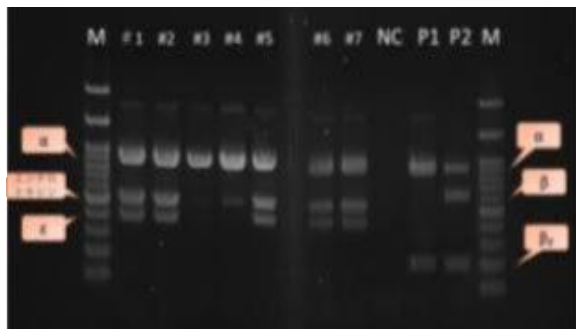
【細菌検査結果】

主要 6 臓器からは有意菌は分離されなかった。小腸内容物の直接塗抹をグラム染色し、グラム陽性大桿菌を確認後、CW 寒天培地に塗布。乳光反応を示した株を血液寒天培地で純培養し、溶血を確認した。その際、1 株培地上に広がるように滑走を示すコロニーを形成する株を認めた。単離した 7 株を API キットにかけ *C. perfringens* と同定し、その後定量培養を行った。*C. perfringens* は小腸内容 1 g あたり 4.7×10^6 個で定量陽性、大腸菌は 1 g あたり 1.3×10^6 個で定量陰性であった。また、Salmonella 属菌は非検出であった (図)。

	腸管感染性 (77A株)	母牛 のF型に由来 した菌株	5%草食性 採草地	API 20A	白血、DNA 検出地
主要6菌種	NT	NT	有意なし	NT	NT
小腸内容物	グラム陽性 大群菌	乳光反応+ 4.7×10 ⁸ /g 定量的性	2株もF型PCR 陽性 毒原菌 検出コロニー (4株)	C.Perfringens 89% 99.9%	+ Salmonella属菌 検出 + 大腸菌 1.3×10 ⁸ /g 定量的性

図 2

C.perfringens と同定した 7 株について PCR にて毒素検査を行ったところ、5 株から 毒素、エンテロトキシン、毒素を、2 株から 毒素、エンテロトキシンを検出した (図 2)。エンテロトキシンに関しては陽性コントロールがないため、参考結果とした (図 3)。



P1、P2：豚由来株

図 3

PCR にて 毒素、エンテロトキシン、毒素の毒素パターンを持つ 5 株を D 型。 毒素、エンテロトキシンの毒素パターンを持つ 2 株を F 型と判別した。

【薬剤感受性結果】

C.perfringens と同定した 3 株に対して 12 剤の薬剤感受性試験を実施した。嫌気性菌に効果がある薬剤は概ね感受性であった (図 4)。

菌株	PCG	ABPC	CEZ	SM	EM	LCM
#1	S	S	S	R	S	R
#2	S	S	S	R	S	R
#3	R	S	S	R	R	R

菌株	DOXY	OTC	ERFX	MBFX	TML	SXT
#1	S	S	I	S	S	R
#2	S	S	I	I	S	R
#3	S	S	I	S	S	R

図 4

【追加検査】

同居牛の直腸便と 飼槽やウォーターカップ、牛床や通路、隣接する採草地などから計 41 か所環境採材を行い、*C.perfringens* の分離 培養を実施した。

その結果、同居牛の直腸便と 丸で囲む場所から表 1 で示す毒素型の *C.perfringens* を検出した (図 5、表 1)。

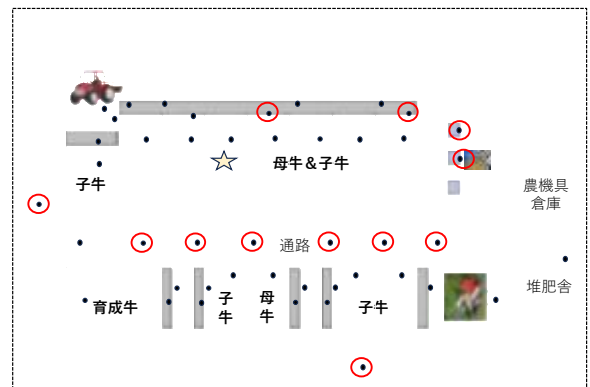


図 5

毒素型/採材場所	A	D	F	α/β ₂
直腸便 (12頭)	5	—	3	—
牛舎床 (12ヶ所)	5	2	1	—
飼槽 (6ヶ所)	2	—	1	—
水カップ (5ヶ所)	—	—	—	—
飼料 (2種)	1	—	—	1
堆肥舎 (1ヶ所)	—	—	—	—
採草地 (3ヶ所)	2	—	—	—

(単位：頭、ヶ所)

表 1

【病理学的検査】

HE 染色では小腸のび慢性粘膜出血、腸上皮壊死、絨毛の萎縮および癒合、大腸の陰窩膿瘍が散見された。他の臓器では腎臓の糸球体・皮髄質のうっ血、軽々な近位尿管上皮の変性等の所見が得られたのみで、毒素が親和性を示すと報告されている中枢神経や心臓、肺に明らかな病変は認められなかった。

また回腸、盲腸のグラム染色と家兎抗 *Clostridium* sp. 抗体 (ViroStat) を用いて免疫組織化学的検査を実施した。グラム染色において腸粘膜が剥離、脱落した表層および出血巣内や粘膜深部にグラム陽性菌が観察され、免疫染色で同部位に陽性反応が認められた (図 7)。

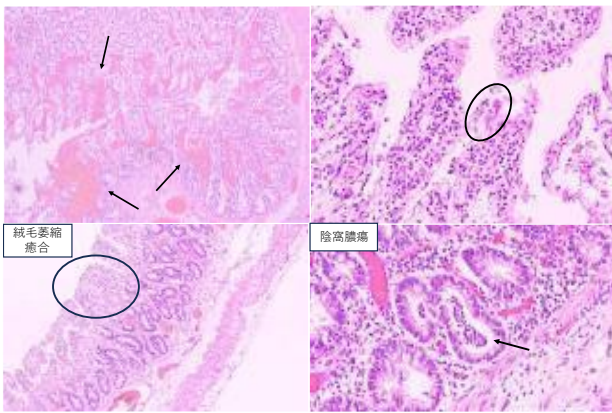
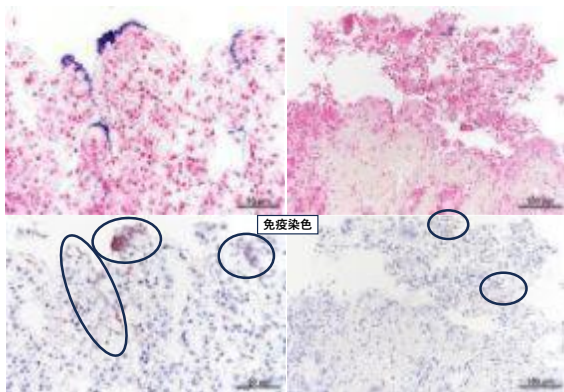


図 6



【まとめと考察】

今回突然死した黒毛和種子牛の腸管内より D 型および F 毒素型の *Clostridium perfringens* を分離しました。

追加検査により D 型や F 型株を同居牛が保有しているか、環境にどれだけ分布しているかを調べたところ、F 型は直腸便や飼槽から検出され、D 型に関しては農場の一部の床から検出された。飼槽や飼料を入れているパケツなどから分離されていることもあり、感染源となる可能性が考えられるため、牛舎内の清掃や、消毒の徹底が重要である。

薬剤感受性試験では、嫌気性菌に効果があるとされる薬剤は概ね感受性であった。

病理学的検索ではグラム陽性桿菌を伴う壊死性出血性腸炎を認め、グラム染色で菌体を認めた部位と一致する位置に免疫組織化学的検査で陽性が確認された。

しかし D 型の毒素が親和性を持つといわれる、中枢神経や、心臓、肺などに明らかな大きな病変は認められず、腎臓のうっ血や、肺のごく一部で水腫が見られたのみであった。

このことから、今回の症例は既報にあるのと同様に、何らかの要因で腸管内に異常増殖した *Clostridium perfringens* 産生毒素により壊死性出血性腸炎を起こしたことが死亡原因と推察した。

本毒素型は分離事例が極めて少なく、データの集積と併に病原性の解明を進めていくことが必要と考える。

【結果】

外貌所見では、左耳介下垂と左眼瞼下垂がみられ、左鼓室胞は、乳白色泥状物で充満していた。剖検では、肺は、左前葉に硬結部位(4×3×1cm)が認められ、壁側胸膜と線維性物で癒着、左後葉に3~5mm大の乳白色結節が多巣状にみられた。胸腔内に胸腺は認められず、頸部胸腺は、右頸部に3×2×0.5cm大の胸腺が脂肪織内に認められた。(図3)。

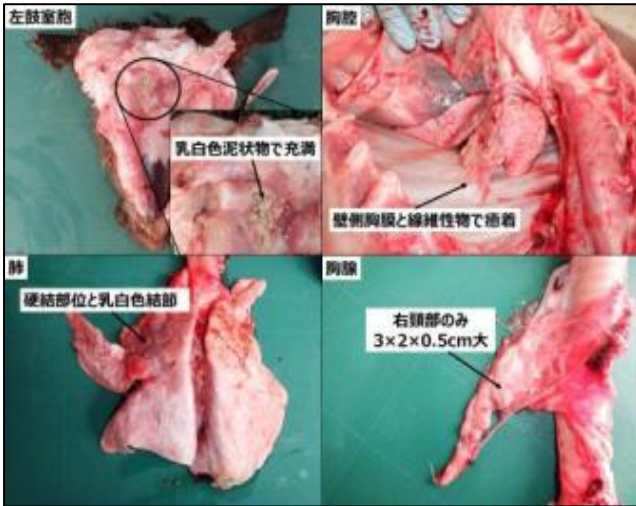


図3 肉眼所見

組織学的に、左鼓室胞~左内耳では、壊死性化膿性炎症が見られ、既存構造は大きく崩壊、好中球、リンパ球、マクロファージ、デブリ、グラム陰性菌塊がみられた(図4)。



図4 左鼓室胞~左内耳の所見

肺は、壊死性化膿性炎症であり(図5)、多巣状性に壊死巣と膿瘍形成がみられ、線維芽細胞の増生を伴って好中球や燕麦様細胞、マクロファージ、グラム陰性菌塊が浸潤する部位もみられた。胸膜、小葉間結合組織は水腫性に肥厚し、多数の赤血球、線維素、好中球、デブリが貯留していた(図6)。

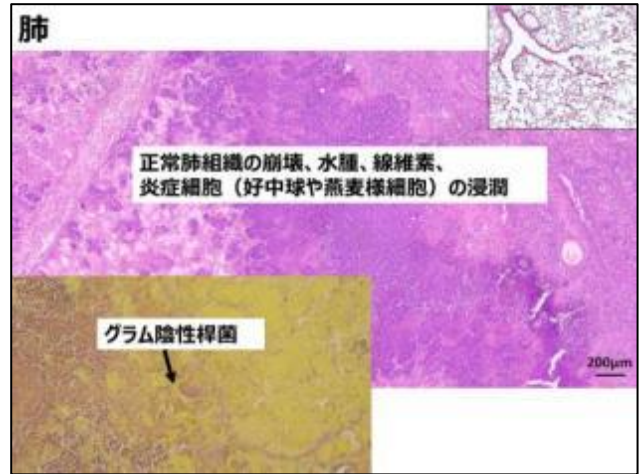


図5 肺 壊死性化膿性炎症

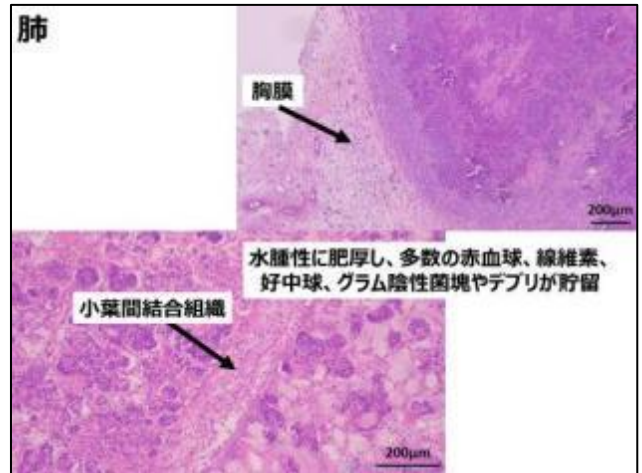


図6 胸膜・小葉間結合組織の所見

胸腺は低形成病変であり、皮質-髓質境界は不明瞭で(図7)、皮質リンパ球は減数、小葉間結合組織は増生し一部皮質へ浸潤、ハッサル小体は髓質外にもみられた(図8)。

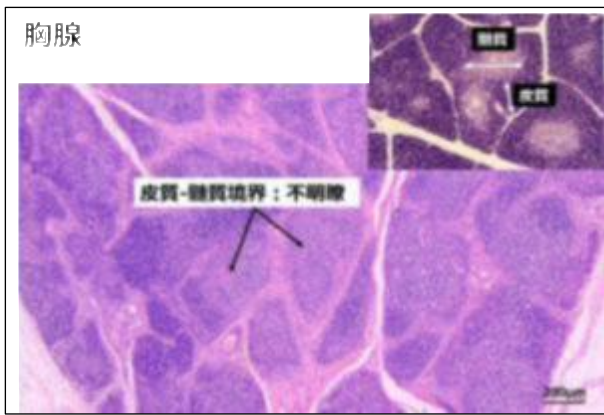


図7 胸腺



図8 胸腺

肺門リンパ節では、洞内へ好中球が中程度浸潤、胚中心はみられなかった(図9)。



図9 肺門リンパ節

細菌検査では、肺と左鼓室胞より大腸菌が純培養的に分離、PCR 検査では各種病原因子は陰性であっ

た。マイコプラズマ PCR 検査は陰性、BVD PCR 検査も陰性であった(図10)。

結果

細菌学的検査：左鼓室胞と肺より大腸菌が純培養的に分離

大腸菌PCR検査：全て陰性

臓器	毒素					接着因子		鉄取込	
	LT	STa	STb	Stx1	Stx2	cdt II	eae	afa8	iutA
左鼓室胞	-	-	-	-	-	-	-	-	-
肺	-	-	-	-	-	-	-	-	-

・下痢原性大腸菌：LT、STa、STb、Stx1、Stx2、eae
 ・腸管外病原性大腸菌 (ExPEC)：cdtIII、afa8、iutA

マイコプラズマ検査：*M.bovis*, *M.dispar*, *M.bovirhinis* 陰性

BVD検査：陰性

20

図10 その他の検査結果

【考察】

本症例の中内耳炎及び胸膜肺炎は、検索した主要な大腸菌病原因子は陰性であったことから、病原因子のない大腸菌による日和見感染の可能性が考えられ、肺門リンパ節に胚中心がなく、胸腺低形成であることから、病態の増悪因子として、免疫機能の先天性欠損による免疫不全が考えられた。当該子牛の斜頸発症機序は、逆子産道の大腸菌を含んだ羊水誤嚥の可能性 咽喉頭 耳管 左中内耳 壊死性化膿性中内耳炎 斜頸と推察され、経気道的に肺炎が惹起されたと考えられた(図11)。

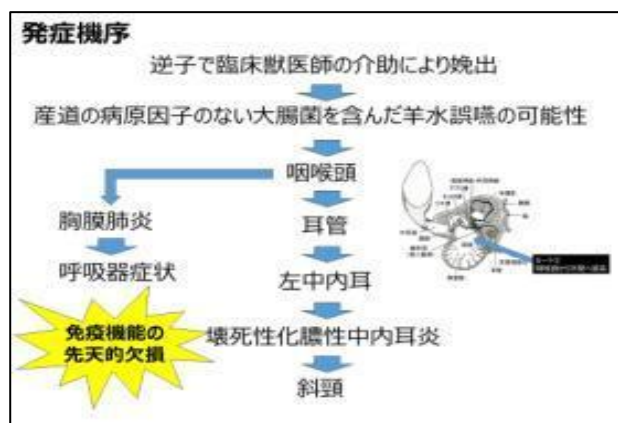


図11 発症機序

10 .八重山地域の牧野に分布するマゲシマチマダニの形態学的特徴と季節消長及び *Theileria orientalis* 保有調査

八重山家畜保健衛生所
中尾聡子 松尾行高 大田恵一郎

【はじめに】

八重山地域では過去にオウシマダニが媒介する牛バベシア症が流行していたが、1971年から本格的なオウシマダニの駆除を実施し、オウシマダニの撲滅とともにその発生は見られなくなった。その後も八重山地域ではオウシマダニの清浄化維持のために牧野ダニ検査を継続しており、いくつかのマダニの存在が確認されている(図2)。

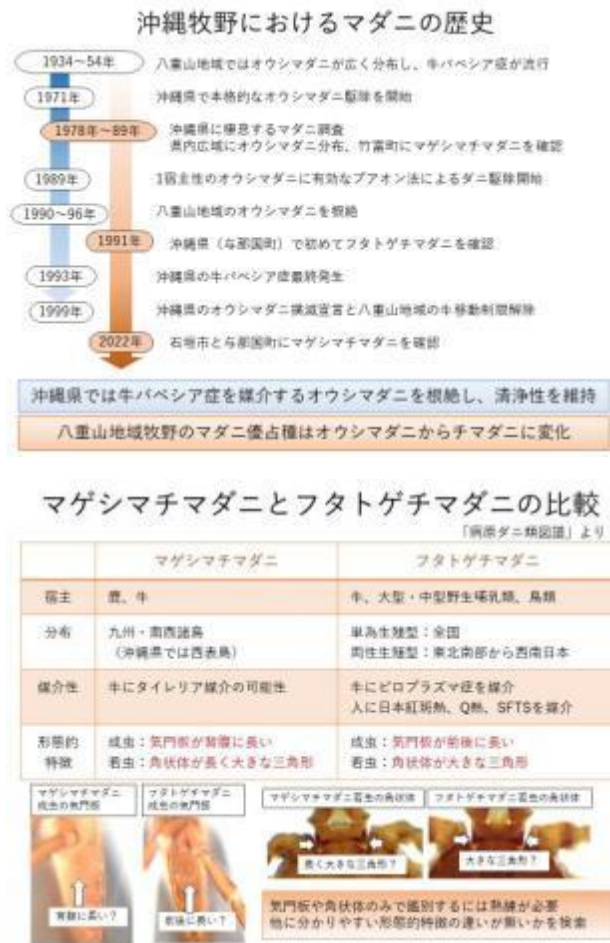


図1, 2

今回、八重山地域の牧野に分布する2種のマダニ(マゲシマチマダニとフタトゲチマダニ)について定点観測を行い、それぞれの形態学的特徴、季節消長及び *Theileria orientalis* の保有について調査を実施したので報告する。

【材料及び方法】

2023年1月から12月にかけて、石垣市の1牧野(A)と与那国町の2牧野(B,C)で実施した。石垣市では毎月、与那国町では2ヶ月に1回、フランネル法でマダニを採集した。採集したマダニは99.5%エタノールに浸漬し、幼虫、若虫、成虫に分類して個体数を集計した。若虫と成虫は光学顕微鏡下で形態学的特徴を観察し、種を同定した。採集したマダニは全て99.5%エタノールに浸漬し、-20で保存した。マゲシマチマダニ成虫の一部は帯広畜産大学原虫病研究センターへ送付し、DNA抽出と *T. orientalis* の遺伝子検査を実施した(図3)。



図3

【結果】

採集したマダニの個体数は幼虫 6,421 個体、若虫 3,930 個体、成虫 829 個体の合計 11,180 個体だった。種を同定した若虫と成虫の個体数はマゲシマチマダニの若虫 3,592 個体、成虫雄 421 個体、成虫雌 339 個体、フタトゲチマダニの若虫 338 個体、成虫雌 69 個体だった。マゲシマチマダニは牧野 A, B から、フタトゲチマダニは全ての牧野から採取された。

石垣市牧野 A ではマゲシマチマダニとフタトゲチマダニの2種が採集された。季節消長において、マゲシマチマダニは成虫オス、成虫メス、若虫が通年採集されたが、フタトゲチマダニは成虫メスが3月～8月、若虫が3月～10月にかけて採集された。フタトゲチマダニの成虫は全

T. orientalis 遺伝子検査

主要ピロプラズマ表面蛋白質 (Major Piroplasma Surface Protein : MPSP) をコードする原虫遺伝子を標的としたPCR検査

Epidemiological survey of *Theileria orientalis* infection in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido, Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 71: 937-944, 2009.
Ota, N., Mizuno, S., Kuboki, N., Igasaki, I., Nakamura, Y., Yamashita, H., Harazuka, T., Fujii, K., Owa, S., Hata, H., Iwano, S., Matsui, S., Naga, M., Matsumoto, K., Inokuma, H. and Yokoyama, N.

材料：2022年に採集したマゲシマチマダニ成虫 52個体

方法：DNA抽出キット (ISOHAIR) を用いて各個体からDNA抽出
PCR試薬 (Ampdirect® Plus) を用いて遺伝子検査

結果：陽性10検体 / 52検体



図 8

【まとめと考察】

石垣市と与那国町の牧野において初めてマゲシマチマダニが確認された。マゲシマチマダニとフタゲチマダニは形態学的に類似しており、同一牧野に分布するマゲシマチマダニとフタゲチマダニの鑑別は既報の比較法で困難であったため、本調査ではフタゲチマダニと比較して、マゲシマチマダニの形態学的特徴について取りまとめた。

体長と体色を比較すると、若虫、成虫共にマゲシマチマダニはフタゲチマダニより有意に小さく、体色はマゲシマチマダニが黄褐色、フタゲチマダニが茶色であり肉眼での鑑別が可能である。また触肢の形態を比較すると、マゲシマチマダニ成虫の触肢第2節内側毛は片側5~6本であり、触肢第3節外縁が触肢第2節外縁より先張り出し段差を有するという特徴が見られた。

季節消長において、マゲシマチマダニは通年活動が見られたが、フタゲチマダニ成虫は3月~9月にかけて限定的に活動が見られ、2種のチマダニの季節消長は異なることが明らかとなった。フタゲチマダニの季節消長は2004年に大城らが発表した牛体ダニの結果と概ね一致していたが、マゲシマチマダニの季節消長はこれまで報告がなく、今回が初の報告である。また、マゲシマチマダニの成虫から *T. orientalis* 遺伝子が検出されたことから、牧野におけるマゲシマチマダニの小型ピロプラズマ媒介性が示唆された。

牛の *T. orientalis* 感染率は牧野ダニの発生活動に一致すると報告があり、以前はフタゲチマダニの消長に合わせた牧野衛生プログラムを推奨してきた。しかし八重山地域の放牧牛は *T. orientalis* 寄生率が高く、重度寄生すると貧血を起こすことがある。従って通年放牧が一般的な八重山地域では、牧野に分布するマダニに合った牧野衛生プログラムを実施することが望ましいと考えられた。

本調査を実施するにあたり、多大なるご助言とご協力を頂きました。国立大学法人帯広畜産大学の横山直明教授、白藤梨可准教授、原虫病研究センターの皆様と国立大学法人千葉大学の池原譲教授、池原早苗助教、大木翔太技術補佐員に厚くお礼申し上げます。