

8 牛呼吸器病症候群による搾乳牛の集団死亡事例

○林 朋弘 藤森 英雄 竹内 美穂 齋藤 秀一 寺崎 敏明

要約

平成 31 年 1 月 10 日、A 農場において、搾乳牛での呼吸器症状集団発生があり、症状の見られた 3 頭の鼻腔スワブと血液について病性鑑定を実施した。翌日には、2 頭が死亡したため、病性鑑定を実施した。

剖検では、2 頭の死亡牛すべてで胸腔内の繊維素析出、肺の胸壁への癒着・肝変化、脾臓表面の白斑が見られ、肺の病理組織標本では、燕麦様細胞が認められた。ウイルス検査では、鼻腔スワブすべてで RS ウイルス簡易検査および牛 RS ウイルス (Bovine respiratory syncytial virus 以下、「BRSV」という。) 遺伝子陽性であった。しかし、死亡牛肺由来検体では、RS ウイルス簡易検査陽性でありながら BRSV 遺伝子陰性となるものがあった。細菌検査では、鼻腔スワブ 3 検体中 1 検体および死亡牛の肺より *Mannheimia haemolytica* (Mh) が分離された。BRSV 系統樹解析の結果は遺伝子型 3、Mh 血清型別 PCR の結果は 1 型であった。

以上の結果から、本事例は BRSV と Mh の混合感染による牛呼吸器病症候群 (bovine respiratory disease complex) (BRDC) と診断した。A 農場では BRSV を含む呼吸器病混合ワクチンを年一回接種していた。しかし、BRSV の遺伝子型がワクチン株と異なることで、個体によってはワクチン効果が十分ではなかった可能性があり、Mh ワクチンについては未接種であった。BRSV 感染後、上部気道常在菌である Mh の肺感染によってごく短期間で複数頭が死亡するに至ったと考えられた。

A 農場の概要

A 農場の飼養規模および農場内各施設の配置は図 1 のとおりである。

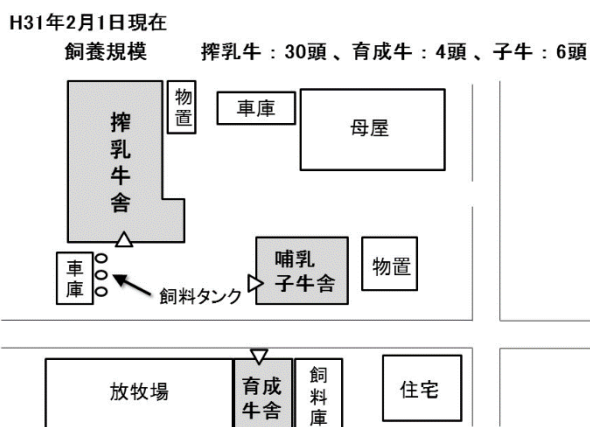


図1 A農場概要

牛舎は公道を隔てて 3 棟存在しており、各牛舎の入口は図中の「△」となる。牛舎に防鳥ネ

ットを張り、道路際にはロープを設置するなど飼養衛生管理上の問題点は特になく、BRSV を含む呼吸器病の混合ワクチンを年 1 回、発生の直近では平成 30 年 9 月に接種していた。本事例では発症・死亡ともに搾乳牛舎のみで見られ、哺乳子牛舎および育成牛舎では全く見られなかった。

発生状況

平成 31 年 1 月 10 日、診療獣医師より A 農場搾乳牛舎にて呼吸器症状が集団発生している旨の連絡があった。搾乳牛 3 頭 (65 ヵ月、53 ヵ月、51 ヵ月齢) の鼻腔スワブと血液が搬入され、血液生化学検査のほか、RS ウイルス簡易検査、BRSV ほか各種ウイルス (牛ウイルス性下痢・粘膜炎ウイルス、牛パラインフルエンザウイルス

3 型、牛コロナウイルス、牛アデノウイルス) 遺伝子検査、および細菌検査を実施した。

翌日、病性鑑定依頼のあった 3 頭中 1 頭 (53 ヲ月齡) を含む搾乳牛 2 頭が死亡したため死体を家保に搬入、剖検および病理組織検査、BSE 検査のほか、ウイルスおよび細菌検査を実施した。

更に 12~14 日にかけ搾乳牛 3 頭 (78、93、94 ヲ月齡) が同様の症状を示し死亡した。

これとは別に A 農場では 1 月 8 日に 1 頭の搾乳牛 (51 ヲ月齡) が死亡しており、BSE 検査後の死体が保管されていたことから、1 月 16 日に剖検を実施したところ、肺病変が認められた。このため、鼻腔および気管スワブを材料とした RS ウイルス簡易検査を実施したところ、陽性を示した。

搾乳牛舎内における各飼養牛の位置は図 2 のとおりである。1 月 10 日に鼻腔スワブと血液を採材した発症牛は、翌日死亡した 1 頭を除いて最終的に治癒した。発症および死亡牛の多くが入口に近い手前半分に集中していたため、BRSV 等は搾乳牛舎の入り口から侵入したものと考えられた。

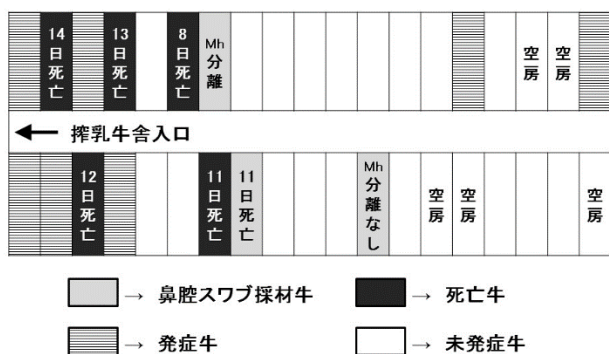


図2 搾乳牛舎内 各飼養牛の位置

剖検所見および病理組織検査

1 月 10 日病性鑑定依頼のあった血液 3 検体は、生化学検査では、特に異常が認められなかった。

11 日に実施した死亡牛の剖検所見は表 1 のとおりで、肺の胸壁への癒着や胸腔内の線維素析出、脾臓表面における白斑の点在、後葉後部を

除く肺全体の肝変化などが共通していた。

病理組織所見は、図 3~4 のとおりである。気管粘膜における上皮細胞の変性や下組織の充出血、肺の各部における小葉間結合組織の拡張と繊維素の析出、燕麦様細胞の浸潤も確認できる化膿性肺炎の所見が認められた。

その他の病理組織所見として、脾臓におけるヘモジデリン沈着、脳における微小出血と血管の拡張が認められたが、BRDC との関連性は解明できなかった。

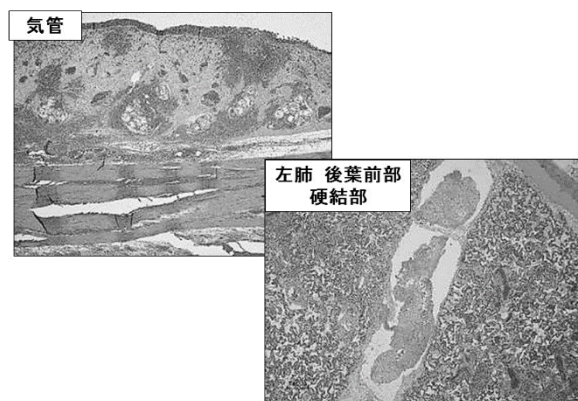


図3 1月11日死亡牛 (65ヵ月齡) 病理組織検査結果①

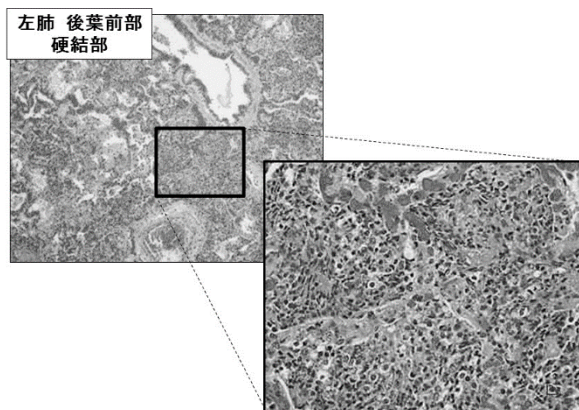


図4 1月11日死亡牛 (65ヵ月齡) 病理組織検査結果②

ウイルス検査結果

10 日に搬入された鼻腔スワブでは、市販の市用キット (イムノエース RSV Neo : タウンズ) を用いた RS ウイルス簡易検査及び BRSV 遺伝子検査において、全検体が陽性となった。牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルスをはじめとするその他のウイルスの遺伝子検査は陰性であった。

10 日に実施した病性鑑定結果を受けて、11

日の死亡牛では鼻腔スワブの RS ウイルス簡易検査のほか、肺材料の RS ウイルス簡易検査、BRSV および牛アデノウイルスの遺伝子検査を実施した。RS ウイルス簡易検査は全頭で陽性だったが、BRSV 遺伝子検査では1頭が陽性で1頭が陰性だった。牛アデノウイルス遺伝子検査は全頭陰性だった。

分離された BRSV 遺伝子について、農研機構・動物衛生研究部門（動衛研）に系統樹解析を依頼した結果、図5のとおり遺伝子型3に該当することが判明した。

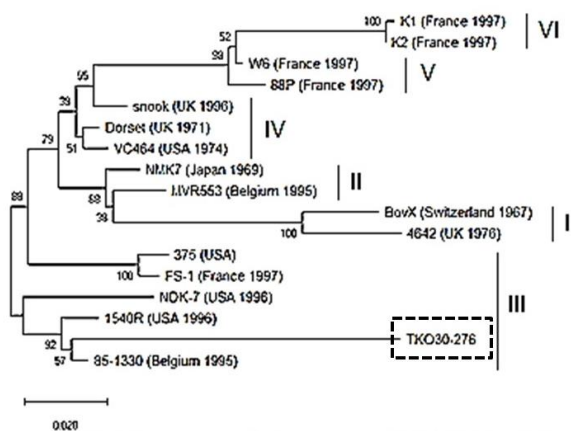


図5 分離BRSV遺伝子の系統樹解析

細菌検査結果

細菌検査結果は図6のとおりである。

- ・ 10日搬入 鼻腔スワブ
各検体より グラム陽性球菌のほか、3検体中1検体よりグラム陰性短桿菌を分離、Mhと同定 → 分離菌 A
- ・ 11日搬入 死亡牛
2頭とも肺より Mh様グラム陰性短桿菌を分離、他臓器からの有意菌の分離なし、全てMhと同定
 - 65ヵ月齢 後葉後部（含気） → 分離菌 B
 - 後葉前部（無気） → 分離菌 C
 - 53ヵ月齢 後葉後部（含気） → 分離菌 D
 - 後葉前部（無気） → 分離菌 E

Mannheimia 属菌同定PCRにて、A~Eは全てMhと確認

図6 細菌検査結果

10日に搬入された鼻腔スワブから *Staphylococcus* 属や *Aerococcus* 属等のグラム陽性球菌が分離されたほか、3検体中1検体からグラム陰性短桿菌が分離された。この菌（以下：分離菌 A）は5%綿羊血液寒天培地上でαブ

ライム型の溶血を示し、市販の同定キット（アピ 20NE：ピオメリユー・ジャパン）による同定により Mh という結果を得た。

11日死亡牛は肺からのみ分離菌 A と同所見のグラム陰性短桿菌4株（以下：分離菌 B~E）が分離され、その他臓器からの有意菌の分離はなかった。分離された菌株は、オキシダーゼ試験の結果が異なったが、同定キットによる結果はいずれも Mh であった。

同定に使用したキットは、*Mannheimia* 属の各菌種¹⁾までは同定できず、*Mannheimia* 属菌は全て Mh と同定される。そのため、A~E の各分離菌について *Mannheimia* 属菌5種のPCR同定法に関する報告²⁾を参考にPCRを実施した結果、全て Mh であると確認された。

A~E の各分離菌について一濃度ディスク法による薬剤感受性試験を実施した結果を表2、3に示す。β-ラクタム系、クロラムフェニコール系、ペプチド系、キノロン系およびST合剤には一様に感受性が認められた。一方でテトラサイクリン系、アミノグリコシド系およびマクロライド系には耐性を示し、「死亡牛ではオキシテトラサイクリンの効果が芳しくなかった」という診療獣医師からの情報どおりの結果となった。このため診療獣医師には、今後同様の事例に遭遇した際、β-ラクタム系を第一次選択薬として使用するよう依頼した。

莢膜抗原の違いによって12種ある Mh の血清型のうち、日本国内で分離される株の4割強が1型であるほか、次に多い6型および2型を合わせると分離割合の9割強を占めるとされている³⁾。従来、Mh の血清型別は免疫血清によるスライド凝集反応を動衛研に依頼するしかなかったが、1、2、6型の型別PCR法に関する報告⁴⁾を参考に、PCRによる血清型別を実施した。この手法は1、2、6型以外には対応していないが、泳動の結果図7のとおり、A~Eの各分離菌とも306bp付近でのみバンドが発現したことで、本事例で分離された Mh は全て1型のみであったと

判明した。

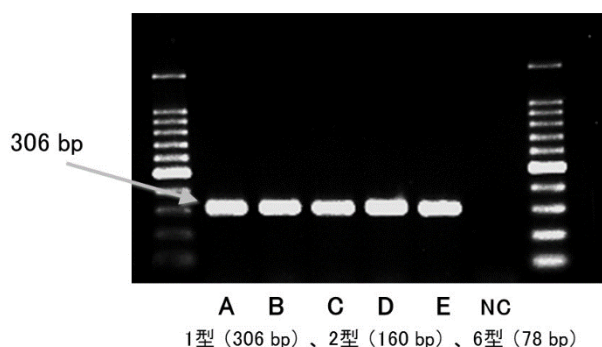


図7 Mh血清型別PCR

まとめおよび考察

RS ウイルス簡易検査及び BRSV 遺伝子検査の陽性が認められたほか、有意な菌として Mh1 型が分離されたことに加え、その他有意なウイルスや菌の分離がなかったことから、本事例は両者の混合感染による BRDC と診断した。

BRSV についてはここ数十年、全国的に「遺伝子型 3」が流行していると考えられるが、日本国内のワクチン株として使用されている rs-52 株は遺伝子型 2 に含まれる。遺伝子型がワクチン株と異なることで、個体によってはワクチン効果が十分ではなかった可能性があり、結果として細胞性免疫が上がらなかったものと考えられた。これに加えて A 農場では Mh ワクチンも未接種であったため BRSV 感染後、常在菌であった Mh の肺感染によってごく短期間で複数頭が死亡するに至ったと考えられた。

当所からは Mh ワクチンの接種を指導するとともに、BRSV や Mh が外部から侵入した可能性について説明した。A 農場は畜舎の消毒強化に加え、一部の牛について薬剤を替えて治療を継続した結果、1 月 18 日の治療を最後に本事例は終息した。

その後、続発は無いが同一農場で短期間に搾乳牛が 6 頭も死亡する事例は都内では初発であるため、このような事例を起こさないよう、今後とも迅速かつ適切な病性鑑定を心がける所存

である。

謝辞

BRSV の系統樹解析にご協力頂きました動衛研・牛ウイルスユニット長の畠間真一先生、ならびに Mh 血清型別 PCR の手法についてご教示頂きました病原機能解析ユニット長の高松大輔先生に深謝致します。

参考文献

- 1) Angen, O., Mutters, R., Caugant, D. A., Olsen, J. E. and Bisgaard, M. 1999. Taxonomic relationships of the [*Pasteurella*] *haemolytica* complex as evaluated by DNA-DNA hybridizations and 16SrRNA 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. Bacterio 1. 49:67-86
- 2) 勝田 賢、小嶋 暢、富山美奈子ほか：牛から分離される *Mannheimia* 属菌の PCR による同定法の確立、The Journal of Farm Animal in Infectious Disease Vol4 No.3, 81-86 (2015)
- 3) 明石博臣、江口正志、神尾次彦ほか：牛病学〈第三版〉、近代出版、267~270
- 4) Cassidy L. Klima, Rahat Zaheer, Robert E. Briggs, et al. : A multiplex PCR assay for molecular capsular serotyping of *Mannheimia haemolytica* serotypes 1, 2 and 6, Journal of Microbiological Methods 139, 155-160 (2017)