

Mannheimia varigena 感染による化膿性髄膜炎及び 肺の多発性巣状壊死を呈した和牛子牛の1例

阿部祥次^{1)†} 小池新平¹⁾ 半田真明¹⁾ 蓼沼亜矢子¹⁾
田中理栄子¹⁾ 市川 優²⁾ 湯澤裕史²⁾

1) 栃木県北家畜保健衛生所 (〒329-2713 那須塩原市緑2-12-14)

2) 栃木県中央家畜保健衛生所 (〒321-0905 宇都宮市平出工業団地6-8)

(2012年3月16日受付・2013年2月5日受理)

要 約

正常に出生した黒毛和種の子牛が生後すぐに起立不能を呈し、4日後に死亡した。細菌学的検査の結果、脳、肺、腎臓及び脾臓から *Mannheimia* 属菌が分離された。分離菌は当初、生化学的性状試験により *Mannheimia haemolytica* と同定されたが、16S リボゾーム RNA の遺伝子配列解析の結果、*M. varigena* (*M. v*) と再同定された。病理組織学的検査では、化膿性髄膜炎、化膿性ブドウ膜炎及び急性壊死性肺炎が観察された。免疫組織化学的染色では、脳、眼球及び肺に *M. v* 陽性抗原が確認された。母牛からも *M. v* が分離され、感染源と考えられた。今後、本菌の病原性や保菌状態等について調査する必要があると示唆された。——キーワード：子牛、髄膜炎、*Mannheimia varigena*。

----- 日獣会誌 66, 248~251 (2013)

Mannheimia 属菌は、*Mannheimia haemolytica* complex (*M. h. c*) と呼ばれ、1999年に *Pasteurella* 属から新たに分類された。*M. h. c* は現在少なくとも5菌種、すなわち *M. haemolytica* (*M. h*)、*M. varigena* (*M. v*)、*M. glucosida*、*M. granulomatis* 及び *M. ruminalis* の存在が明らかにされている [1]。

M. h は牛呼吸器病の原因菌の一つであり、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, 3]。しかし、*M. v* は牛の肺炎、流産、髄膜炎、敗血症、乳房炎及び豚の腸炎など、呼吸器病以外でもさまざまな症状に関与するという報告はあるものの、海外及び国内での発生例も少なく、他の3菌種の病原性を含め依然不明な点が多く残されている [1, 4-7]。

今回、栃木県の和牛子牛に *M. v* による化膿性髄膜炎及び肺の多発性巣状壊死が発生したので、概要を報告する。

材料及び方法

発生状況の概要：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。当該牛の母牛は初産であり、2009年11月20日に

当該子牛は正常に娩出されたが、起立不能を呈し、自力での哺乳欲がなかったため、畜主がチューブで代用初乳を強制投与した。その後も起立不能の状態が続き哺乳欲が改善されなかったため、11月24日に獣医師が初診したが、リンゲル液を補液している間に死亡が確認された。

材料：当該子牛の主要臓器を用いた。また、母牛の鼻腔及び腔スワブを細菌学的検査材料とした。

細菌学的検査：主要臓器、母牛の鼻腔スワブ及び腔スワブを5%羊血液寒天培地及びDHL寒天培地を用い、10%炭酸ガス下及び好気下で37℃24時間培養した。分離株はグラム染色、カタラーゼ試験及びオキシダーゼ試験を行い、簡易同定キット (IDテスト・HN-20ラピッド「ニッスイ」、日本製薬株、東京または、API20E、シスメックス・バイオメリユー株、東京) を用いて同定した。一濃度ディスク拡散法により、アンピシリン (ABPC)、オキシテトラサイクリン (OTC)、カナマイシン (KM)、セファゾリン (CEZ)、ホスホマイシン (FOM)、エンロフロキサシン (ERFX) 及びチアンフェニコール (TP) について薬剤感受性試験を実施した。

16S リボゾーム RNA (rRNA) 遺伝子配列の解析：

† 連絡責任者：阿部祥次 (栃木県北家畜保健衛生所)

〒329-2713 那須塩原市緑2-12-14 ☎0287-36-0314 FAX 0287-37-4825 E-mail : abet07@pref.tochigi.lg.jp

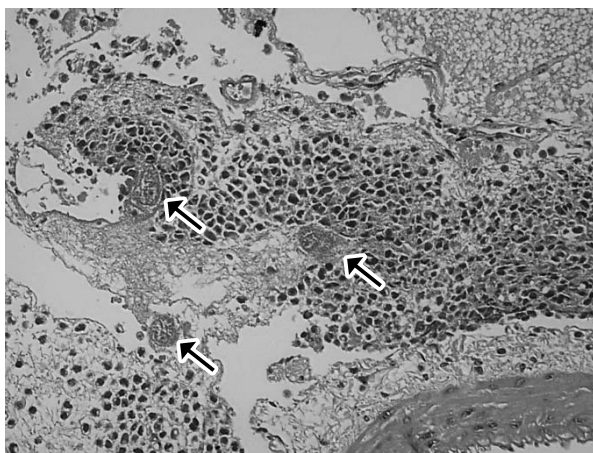


図1 大脳前頭葉
髄膜に好中球の著明な浸潤，線維素の析出及び短桿菌の増殖（矢印）が認められる。（HE染色 ×200）

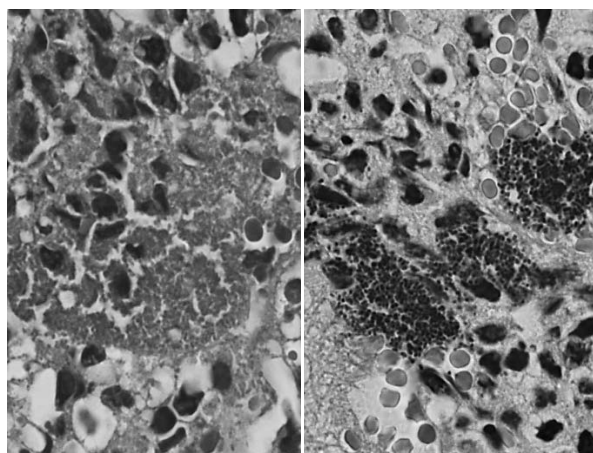


図3 肺
壊死巣内にグラム陰性短桿菌が観察される。（左：HE染色，右：グラム染色 ×1000）

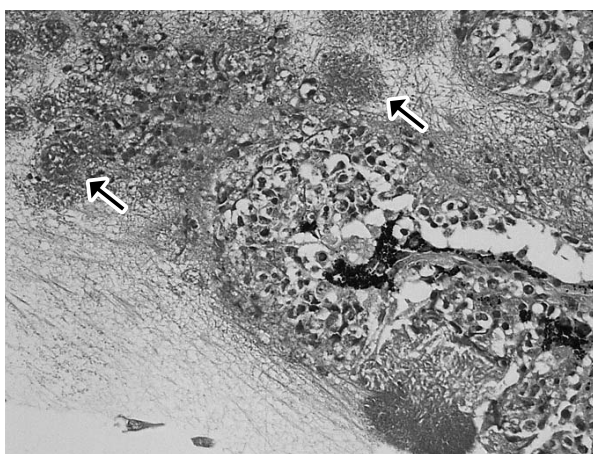


図2 毛様体
好中球の著明な浸潤が認められ，多数の短桿菌（矢印）が認められる。（HE染色 ×200）

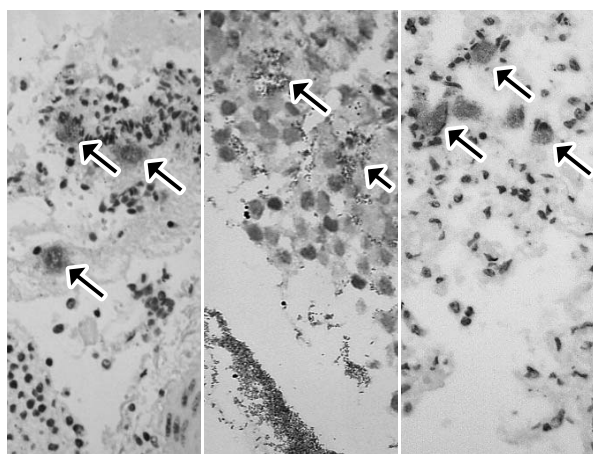


図4 M. v免疫染色像
観察されたグラム陰性短桿菌はM. v免疫染色で陽性（矢印）を示した。（左：髄膜，中央：肺，右：眼球 ×200）

分離株からインスタジーンマトリックス（InstaGene matrix, Bio-Rad, U.S.A.）を用いDNAを抽出し，ユニバーサルプライマーを用い16S rRNA遺伝子の一部をPCR法で増幅した．次に，PCR産物をアガロースゲル電気泳動し，DNAを回収し，ダイレクトシークエンス法で塩基配列を決定した．決定した塩基配列（約1470bp）それぞれについてNCBI Blastによる相同性を調べ，菌種の同定を行った [1]．

病理組織学的検査：主要臓器を20%ホルマリンで固定後，定法に従いパラフィン包埋切片を作製し，HE染色，グラム染色，抗M. h1型家兎血清及び抗M. v家兎血清（動物衛生研究所）による免疫組織化学的染色（M. h免疫染色及びM. v免疫染色）を実施した．

成 績

臨床及び剖検所見：外貌では左眼球における角膜の混濁

濁と鼻梁の軽度左側湾曲が認められた．剖検所見では肺の全葉における充出血及び第四胃粘膜の多発性斑状出血が認められ，胸腺重量は60gであった．脳を含む他の臓器には著変は認められなかった．

細菌学的検査：当該子牛の脳，肺，脾臓，腎臓及び母牛の鼻腔スワブからβ溶血性のコロニーを形成するグラム陰性短桿菌が分離された．分離株はカタラーゼ，オキシダーゼ陽性を示し，当該子牛由来分離株については2種類の簡易同定キットともM. hと同定され，母牛の鼻腔スワブ由来分離株についてはIDテストでは*Actinobacillus pleuropneumoniae*と同定され，API20Eでは該当する菌が当たらなかった．薬剤感受性試験では，当該子牛及び母牛の鼻腔スワブ由来分離株はともにOTC，KM，CEZ及びTPに耐性を認めた．

16S rRNA 遺伝子配列の解析：当該子牛の脳，肺及び母牛の鼻腔スワブ由来分離株はそれぞれ99.73%，

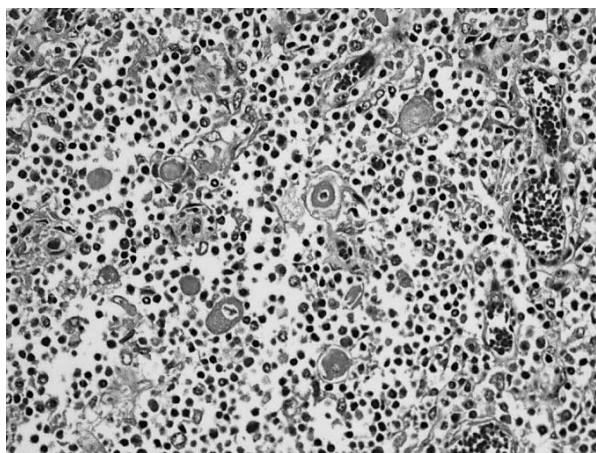


図5 胸腺
髄膜の境界がやや不明瞭となり、リンパ球の軽度の減数が認められる。(HE染色 ×400)

99.46%, 99.87%と *M. v* に対して非常に高い相同性が認められた。

病理組織学的検査：大脳から脊髄の髄膜にかけて広範囲に多数の菌塊と重度の好中球浸潤、マクロファージの軽度浸潤及び線維素の析出が特徴的な急性化膿性髄膜炎(図1)が認められた。眼球においても虹彩及び毛様体に菌塊を伴った、好中球の中等度浸潤を伴う急性の化膿性ブドウ膜炎(図2)と視神経周囲結合織における好中球の中等度浸潤及び中等度水腫が認められた。肺には菌塊を取り囲むエン麦様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。また、肺胞腔内には、羊膜上皮や胎便が観察された。脳、眼球及び肺で認められた菌塊は、グラム染色によりグラム陰性短桿菌であり(図3)、*M. h*免疫染色では陰性、*M. v*免疫染色では陽性を示した(図4)。胸腺は、髄膜の境界がやや不明瞭となり、リンパ球が軽度に減数し、軽度の低形成が認められた(図5)。その他、接合菌による第四胃の真菌性胃炎が認められた。

考 察

本例の分離株は、簡易同定キットで当初 *M. h* と同定された。しかし、*M. h* は一般的に牛呼吸器病原菌の一つであることが知られているが、本例では肺以外に脳、脾臓及び腎臓からも分離された。簡易同定キットでは、*M. h. c* に属する菌を正確に同定することは困難であることが知られており(勝田 賢：*Mannheimia* 属の野外実態と同定法の確立、動物衛生研究所研究報告, 115, 15-18 (2009)), 分離株は *M. h* 以外の菌種である可能性が考えられ、16S rRNA 遺伝子配列の解析を実施した結果、*M. v* と再同定された。母牛の鼻腔スワブからも *M. v* が分離され、薬剤感受性試験結果が一致していたことから、母牛からの感染が疑われた。

虚弱子牛症候群(WCS)の症状として活力の減退、吸乳力の低下または消失及び起立困難があげられる[8]。当該子牛は、正常分娩であったものの、生まれた当初から起立不能を呈し哺乳欲を認めない状態にあり、WCSであった可能性も考えられた。新生子牛の胸腺重量は100~200gであるが、当該子牛は60gと低重量であり、病理組織所見でも低形成を認めていた。WCSの牛では、免疫機能の低下により肺炎や下痢などを発症しやすいといわれている[9]。本例は、易感染状態にあった子牛に本菌が感染した日和見感染症によるものと推察されるが、本菌による感染症がWCSの牛に多くみられるのか、今後例数を重ねて検証する必要があると考えられた。

Angenら[1]は、*M. v* は、呼吸器病以外に流産、乳房炎、心内膜炎及び腸炎からも分離されることを報告しており、国内の *M. v* 感染症は3県で確認され、滋賀県では牛の腸内容から本菌が分離された腸炎[6]、沖縄県では牛の脳及び主要臓器から分離された敗血症[7]、静岡県では豚の肝臓に巣状壊死を引き起こした症例(和久田高志：豚の *Mannheimia varigena* 感染症、静岡県業績発表会集録, 38-40 (2009))が報告されている。このように、本菌は多様な病変をもたらすことが推察される。また、今回分離された *M. v* は多剤耐性が認められ、今後、さらに症例を重ねて本菌の病原性、保菌状況等について検討していく必要がある。

稿を終えるにあたり、16S rRNAの遺伝子配列解析及び *M. v* 免疫染色に協力していただいた佃農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所の勝田 賢主任研究員、川島健司上席研究員、星野尾歌織主任研究員に深謝する。

引用文献

- [1] Angen O, Muttters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M : 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, 84, 103-114 (2002)
- [3] Frank GH : Pasteurellosis of cattle, *Pasteurella* and Pasteurellosis, Adlam C, et al eds, 197-222, Academic Press, London (1989)
- [4] Catry B, Opsomer G, Decostere A, Feyen B, de Kruif A, Haesebrouck F : Fatal meningitis in a calf caused by *Mannheimia varigena*, Res Vet Sci, 77, 187-188 (2004)

- [5] Blackall PJ, Bisgaard M, Stephens CP : Phenotypic characterization of Australian sheep and cattle isolates of *Mannheimia haemolytica*, *Mannheimia granulomatis* and *Mannheimia varigena*, Aust Vet, 80, 87-91 (2002)
- [6] 市川雅子, 山中健吾, 石本明宏, 荒木由季子 : 滋賀県での *Mannheimia* 属菌分離陽性牛の細菌, ウイルス学および病理組織学的調査, 獣医畜産新報, 61, 47-52 (2008)
- [7] 又吉正直, 片桐慶人, 安富祖誠, 相澤真紀, 大城 守, 津波 修 : *Mannheimia varigena* が分離された早産子牛の敗血症, 日獣会誌, 63, 275-277 (2010)
- [8] 小形芳美 : 虚弱子牛症候群, 子牛の科学, 日本家畜臨床感染症研究会編, 第1刷, 98-103, チクサン出版社 (2009)
- [9] Takasu M, Shiota K, Ohba Y, Nishii N, Murase T, Miyazawa K, Kitagawa H : Thymic hypoplasia in Japanese black calves with stillbirth/perinatal weak calf syndrome, J Vet Med Sci, 70, 1173-1177 (2008)

Suppurative Meningitis and Acute Necrotizing Pneumonia in a Japanese Black Calf Due to *Mannheimia varigena* Infection

Tadatsugu ABE^{1)†}, Shinpei KOIKE¹⁾, Masaaki HANDA¹⁾, Ayako TADENUMA¹⁾,
Rieko TANAKA¹⁾, Yutaka ICHIKAWA²⁾ and Hirohumi YUZAWA²⁾

- 1) *Tochigi Prefecture Kenhoku Livestock Hygiene Service Center, 2-12-14 Midori, Nasushiobara, 329-2713, Japan*
- 2) *Tochigi Prefecture Kenou Livestock Hygiene Service Center, 6-8 Hiraidekougyoudanchi, Utsunomiya, 321-0905, Japan*

SUMMARY

A normally born Japanese black calf showed astasia and subsequently died 4 days after birth. *Mannheimia* spp. were isolated from the brain, lungs, kidneys, and spleen by bacteriological examination. Although the isolate was initially classified as *M. haemolytica*, it was later classified as *M. varigena* (M.v) via 16S ribosomal RNA gene sequencing. Histopathological examination revealed suppurative meningitis, suppurative uveitis, and acute necrotizing pneumonia. M.v-immunopositive antigens were detected in the brain, eyeballs, and lungs via immunohistochemical analysis. M.v was isolated also from the dam of the dead calf and was considered the source of infection. Further investigations are needed to establish the virulence and carriers of M.v.

— Key words : calf, meningitis, *Mannheimia varigena*.

† Correspondence to : Tadatsugu ABE (*Tochigi Prefecture Kenhoku Livestock Hygiene Service Center*)
2-12-14 Midori, Nasushiobara, 329-2713, Japan
TEL 0287-36-0314 FAX 0287-37-4825 E-mail : abet07@pref.tochigi.lg.jp

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 66, 248 ~ 251 (2013)