

Mannheimia varigena 及び *Mannheimia* 属 菌 が 関与した子牛の腸炎

市川雅子^{1)†}石本明宏²⁾荒木由季子³⁾

1) 滋賀県家畜保健衛生所 (〒523-0813 近江八幡市西本郷町 226-1)

2) 日精バイリス(株) 滋賀研究所 (〒528-0052 甲賀市水口町宇川 555)

3) 岡山県真庭家畜保健衛生所 (〒717-0013 真庭市勝山 1884-16)

(2016年6月14日受付・2016年8月19日受理)

要 約

2005年に、滋賀県内の肉牛飼養農場で飼養されていた37～40日齢の子牛3例が急性経過で死亡した。いずれの症例も、空腸の腸間膜リンパ節に、高度な腫大が認められた。病理組織学的検査では、小腸粘膜及び大腸粘膜の化膿性病変が特徴的であった。免疫組織化学的検査では、回腸や結腸陰窩農場から *Mannheimia* (*M.*) *varigena* 抗原が検出された。細菌学的検査では、腸内容から *Mannheimia* 属菌が分離され、16S rRNA の塩基配列解析により、*M. varigena* と同定された株及び *Mannheimia* 属菌 5 亜種に相同性を示さない株であった。また、*E. coli*, *Clostridium perfringens*, コロナウイルス及びコクシジウムがあわせて認められた。本症例は *M. varigena* 及び *Mannheimia* 属菌が関与する腸炎であり、宿主の免疫状態及び腸炎を起こす他の病原体の存在が腸炎の重篤化につながるものと考えられた。

——キーワード：子牛の腸炎, *Mannheimia* 属菌, *Mannheimia varigena*.

-----日獣会誌 69, 731～736 (2016)

Mannheimia (*M.*) 属菌は、1999年に *Pasteurella haemolytica* (*P. haemolytica*) が *Pasteurella* 属から *Mannheimia* 属に変更され、現在では、*M. haemolytica*, *M. glucosida*, *M. ruminantis*, *M. granulomatis*, *M. varigena* (Mh complex) の5亜種が存在している [1]。

Mannheimia 属菌による家畜の疾病の報告は、国内においては *M. haemolytica* による牛の呼吸器病が最も多い [2-5]。また、*M. varigena* が関与する家畜疾病については、国内では、牛の早産子牛の敗血症例 [6]、子牛の化膿性髄膜炎及び肺の多発性巣状壊死症例 [7]、哺乳豚の肝臓の巣状壊死症例がある。

一方、*Mannheimia* 属菌による腸炎の報告としては、*M. varigena* が関与すると思われる豚の腸炎の症例及び腸炎を呈した豚の腸から *M. haemolytica* が分離された症例 [8] の報告がある。

今回 *M. varigena* 及び Mh complex のいずれにも相同性を示さない菌が腸炎に関与した症例についてその概要を報告する。

材料及び方法

供試材料：2005年に当所において牛の80例の病性鑑定を行った。その内、空腸の腸間膜リンパ節が高度に腫大し、リンパ節及び腸内容から *Mannheimia* 属菌が分離された3例について検討した。これらは40日齢で死亡した交雑種(症例1)、40日齢で死亡した黒毛和種(症例2)及び37日齢で死亡したホルスタイン種(症例3)であった。

病理組織学的検査：剖検後、肝臓、腎臓、肺、肺門リンパ節、気管、胸腺、心臓、空腸、回腸、盲腸、結腸及び空腸の腸間膜リンパ節について採材し、常法に従い、ホルマリン固定、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い鏡検した。

免疫組織化学的検査：空腸、回腸、結腸、空腸の腸間膜リンパ節及び肺のパラフィン切片を免疫組織化学染色試薬(ヒストファイン SAB PO(R)キット, (株)ニチレイバイオサイエンス, 東京)を用いて SAB 法により実施

† 連絡責任者：小森(市川)雅子(滋賀県家畜保健衛生所)

〒523-0813 近江八幡市西本郷町 226-1

☎ 0748-37-7511 FAX 0748-37-4821

E-mail : komori-masako@pref.shiga.lg.jp

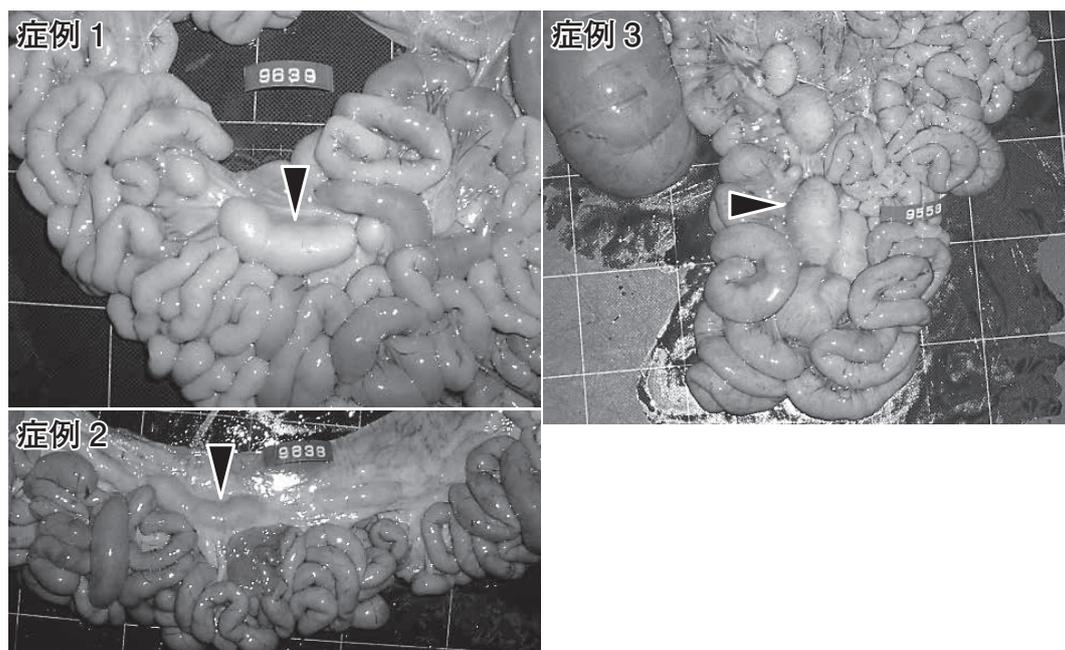


図1 空腸の腸間膜リンパ節像 (症例1, 2, 3)
高度に腫大した腸間膜リンパ節 (矢頭)

した。供試した抗血清は *M. haemolytica*, *M. varigena*, コロナウイルス, *Salmonella* O4 群及び *Salmonella* O9 群に対する家兎免疫血清であり, それぞれ 600 倍に希釈して用いた。

細菌学的検査: 肝臓, 腎臓, 脾臓及び肺について, 5% 羊血液寒天培地にスタンプ培養し, 37°C 48 時間 10% 炭酸ガス培養を行った。また, 空腸内容, 結腸内容及び空腸の腸間膜リンパ節について, 5% 羊血液寒天培地, DHL 寒天培地及びカナマイシン含有 CW 卵加培地に腸内容を定量培養するとともに, 空腸の腸間膜リンパ節についてスタンプ培養を行い, それぞれ 37°C 48 時間 10% 炭酸ガス培養, 37°C 24 時間好気培養及び 37°C 24 時間嫌気培養を行った。分離された菌については, グラム染色, カタラーゼ, オキシダーゼ及び簡易同定キット (ID テスト・HN-20 ラピッド「ニッスイ」, 日水製薬(株), 東京) による生化学性状検査結果をもとに, Cowan and Steel's 医学細菌同定の手引き〈第3版〉により同定した。また, 各症例の腸内容から分離された *Mannheimia* 属菌について, 家兎免疫血清による間接凝集反応により, *M. haemolytica* 莢膜抗原の血清型を調査した。さらに, これらの菌について, 16S rRNA 領域の塩基配列解析を行い, Mh complex に対する相同性を調べた。

ウイルス学的検査: 空腸及び結腸内容を用いて, 牛胎子筋肉細胞 (BFM 細胞) へ接種し, 牛ウイルス性下痢 (BVD) ウイルスの分離を行った。また, 空腸内容, 回腸内容及び結腸内容を用いて, コロナウイルス, ロタウイルス A, ロタウイルス B, アデノウイルス及び BVD ウイルスについて, PCR 法による遺伝子の検出を行った。

成 績

発生状況: 症例1及び3は, 30日齢までの子牛を導入後, 肥育している農家, 症例2は繁殖母牛30頭を飼養する繁殖・肥育一貫経営農家で飼養されていた。症例1及び3は, カーフハッチ, 症例2は, 親付けで飼育されていた。発症後の経過はいずれも急性で, 症例1では12日齢で導入後, 35日齢で下痢が認められ, 40日齢で死亡した。また, 症例2では40日齢で肛門から出血が認められ, その日のうちに死亡した。症例3では21日齢で導入後, 35日齢で元気消失し, 抗生剤により治療されたが, 37日齢で死亡した。

剖検所見: 症例1及び3では, 削瘦及び肛門周囲の糞便付着, 症例2では眼球陥没が認められた。空腸の腸間膜リンパ節はいずれの症例についても, 空腸の太さを上回る大きさに腫大していた (図1)。症例1及び2では結腸出血, 症例3では空回腸の肥厚及び偽膜形成が認められた。また, 症例3では肺の一部に出血が認められたが, 症例1及び2では著変は認められなかった。全症例において, 胸腺萎縮, 症例1及び3では腎杯水腫, 症例2では第四胃幽門部出血が認められた (表1)。

病理組織学的所見: 全症例において, 十二指腸から回腸にかけて絨毛萎縮を伴う腸管粘膜上皮の変性, 脱落が認められた。そのうち, 症例3においては, 十二指腸及び空腸において, 粘膜固有層に高度の好中球, リンパ球及び形質細胞浸潤が認められ, 回腸パイエル板の濾胞や陰窩に膿瘍が多発し, 内部にはグラム陰性菌が認められ, 周囲や固有層に好中球の浸潤がみられ (図2), 盲

表1 剖検所見, 病理組織学的検査及び免疫組織化学的染色検査結果

検査方法	部位/病原体	症 例			
		1	2	3	
剖検所見	外貌	削瘦, 肛門周囲に糞便付着	眼球陥没	削瘦, 肛門周囲に糞便付着	
	腸間膜リンパ節	腫大 (高度)	腫大	腫大 (高度)	
	腸粘膜	結腸出血	結腸出血, 直腸偽膜形成	空回腸粘膜肥厚・偽膜形成	
	肺	-	-	一部出血	
	その他	腎杯水腫, 胸腺萎縮	胸腺萎縮, 第四胃 幽門部出血	腎杯水腫	
病理組織 学的所見	十二指腸	化膿性変化 絨毛萎縮	+	++	
	空腸	化膿性変化 絨毛萎縮	+	+++	
	回腸	化膿性変化 絨毛萎縮	++	+++	
	腸間膜 リンパ節	化膿性変化 類洞水腫	+++	+++	
	盲腸	化膿性変化 上皮から固有層の壊死 コクシジウムの寄生	+++ ++	++ +++	
	結腸	化膿性変化 上皮から固有層の壊死 コクシジウムの寄生	+++ +++ ++	++ ++ +++	
	肺	-	-	化膿性気管支炎	
	肝臓	-	濾胞腫大	血栓多発・多発性巣状壊死	
	脾臓	うっ血・濾胞周囲 好中球浸潤	うっ血・濾胞周囲 好中球浸潤	莢組織の壊死	
	腎臓	-	-	細静脈に血栓・小壊死巣多発	
	その他	-	第4胃幽門部潰瘍	胸腺皮髄境界不明瞭	
	免疫組織 化学的所見	<i>M. haemolytica</i>	-	-	-
		<i>M. varigena</i>	+	+	+
		コロナウイルス	+	-	-
		サルモネラ O4	-	-	-
		サルモネラ O9	-	-	-

+++ : 重度, ++ : 中等度, + : 軽度, - : 認められず

サルモネラ O4 : *Salmonella* O4 群, サルモネラ O9 : *Salmonella* O9 群

腸から結腸にかけても管腔に菌を含む頽廃物が貯留していた。空腸の腸間膜リンパ節では、症例1及び2においては、濾胞内のリンパ球が減少し、軽度の好中球浸潤が認められ、髄洞は好中球及び単核細胞浸潤を伴う水腫が認められた。症例3では、線維素析出と好中球浸潤を伴う濾胞壊死が多発していた。盲腸及び結腸では、症例1及び2においては、粘膜上皮から固有層にかけて、高度の好中球浸潤を認め、フィブリン、頽廃物及び小桿菌を含む偽膜の形成や出血を伴うび爛及び潰瘍が認められ、広範囲にわたり上皮細胞に重度のコクシジウム寄生がみられた。その他の臓器においては、症例3では肺小葉の細気管支や肺腔に高度の化膿性気管支肺炎が認められ、肝臓において多発性に血栓や巣状壊死を認め、脾臓では莢組織の壊死が、腎臓では細静脈に血栓と好中球、

マクロファージ浸潤を伴う小壊死巣が多発していた。また、胸腺は皮髄境界不明瞭に萎縮していた(表1)。

免疫組織化学的所見：症例1及び2の結腸陰窩内と症例3の回腸陰窩膿瘍内から *M. varigena* 抗原が(図3)、症例1の回腸陰窩膿瘍内からコロナウイルス抗原が検出された。また、*Salmomella* 抗原は全症例において検出されなかった(表1)。

細菌学的所見：全症例の結腸内容、症例3の空腸内容、症例2及び3の腸間膜リンパ節から、羊血液寒天培地上でβ溶血性を示す直径約3mmのコロニーを形成する菌が分離された。分離菌のコロニーは通常の *M. haemolytica* よりも大きく、エーゼで掻き取ると褐色を呈していた。分離菌の形態はグラム陰性の小桿菌単在であった。また、症例3の肺から同様の菌が分離された。症例1及

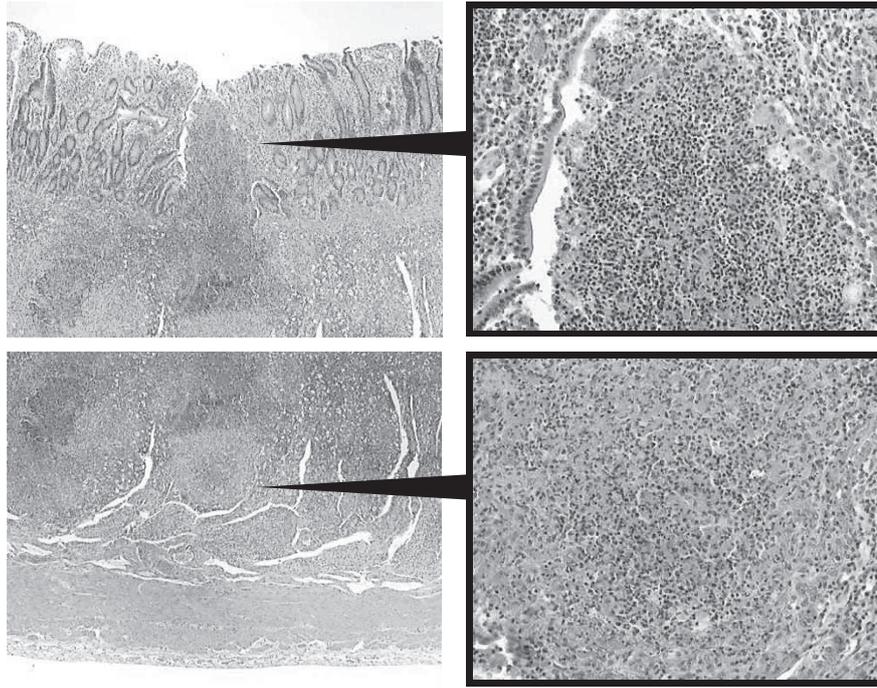


図2 回腸陰窩膿瘍像 (症例3)

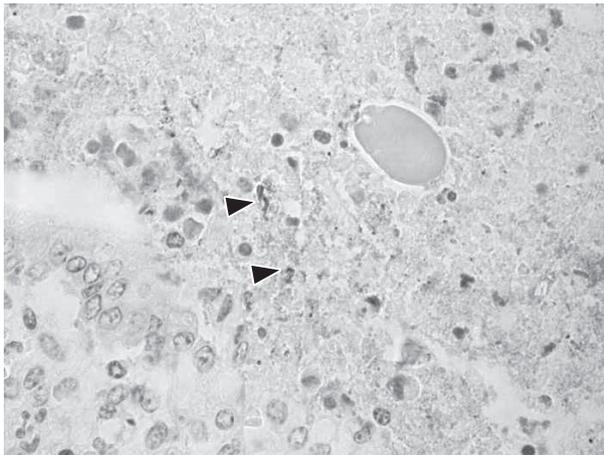


図3 回腸陰窩膿瘍像 (症例3)
M. varigena抗体に対する陽性所見 (矢頭)

び2の腸内容及び腸間膜リンパ節から *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) 及び *E. coli* が多数分離されたが、*Salmonella* は分離されなかった (表2)。

生化学性状より、カタラーゼ及びオキシダーゼ陽性、硝酸塩還元性、ウレアーゼ、オルニチン及びインドール陰性、糖分解性において、マルトース、マンニトール、サッカロース及びキシロースを分解することより *Mannheimia* 属菌であると判定された。また、 β ラクターマーゼ産生の有無により、2パターンの性状を示した (表3)。

また、*M. haemolytica* 莢膜抗原の血清型を調査したところ、いずれにも型別されず、16S rRNA 領域の塩基配列解析により、症例1及び2から分離された菌株は、

M. varigena と同定された。また、症例3から分離された菌株は、Mh complex のいずれにも相同性を示さなかった。

ウイルス学的所見：ウイルス分離においては、BVDウイルスは分離されなかった。PCR法による遺伝子の検出では、症例1及び3の腸内容からコロナウイルスの遺伝子が検出され、ロタウイルスA及びB型、アデノウイルス及びBVDウイルスは検出されなかった (表2)。

考 察

Mannheimia 属菌が腸から分離された症例については、*M. varigena* が関与すると思われる豚の腸炎の症例及び腸炎を呈した豚の腸から *P. haemolytica* が分離された症例 [8] 報告はあるが、牛の腸炎の報告はない。

いずれにも相同性を示さない菌の症例報告として、牛の化膿性脳脊髄炎症例がある。*Mannheimia* 属ではあるが、Mh complex のいずれにも相同性を示さない細菌については、勝田らの調査において供試菌株のうち8.1%の株が菌種レベルまで同定できなかったとの報告がある。

今回報告した症例は、剖検所見で空腸の腸間膜リンパ節の高度腫大及び腸粘膜の偽膜形成や出血といった強い腸炎像を呈し、*Mannheimia* 属菌が $10^{7.9\sim 8.9}$ CFU/g と多数分離された。病理組織所見からも細菌感染を示唆する化膿性または壊死性病変があった。類症鑑別として、サルモネラ症を疑ったが、細菌分離及び免疫組織化学的検査において、陰性であったことから、サルモネラ症は否定された。

表2 細菌学的及びウイルス学的検査結果

検査方法	部位・病原体	症例		
		1	2	3
細菌学的検査	空腸	E.c. 6.9	E.c. 8.8	M. 8.9
		C.p. 4.7	C.p. 7.2	E.c. 9.3
	結腸	M. 8.7	M. 7.9	M. 8.7
		E.c. 6.9	E.c. 8.8	E.c. 9.0
	腸間膜リンパ節	C.p. 4.7	C.p. 7.8	Ent. 8.3
		-	M. ++	M. +
	肺	-	E.c. ++	E.c. ++
		-	P.m. ++	M. +
	肝臓	-	-	-
	腎臓	-	-	-
脾臓	-	-	-	
ウイルス学的検査	ウイルス分離	BVD	-	-
		コロナ	+	-
	PCR	ロタA	-	-
		ロタB	-	-
	アデノ	-	-	
	BVD	-	-	

M. : *Mannheimia* spp. E.c. : *E. coli*
 Ent. : *Enterococcus* spp. C.p. : *Clostridium perfringens*
 P.m. : *Pasteurella multocida*
 分離菌数 数字 : Log CFU/g, + : 少数, ++ : 中等度,
 +++ : 多数, - : 分離されず

全症例において, *E. coli* が多数分離されているが, *E. coli* による死亡は, 毒素原性大腸菌による新生子牛の死亡例, その他の日齢の敗血症例があり, 本症例はこれらに該当しないため, *E. coli* による死亡とは考えられない。

M. varigena が分離された症例1及び2では腸内容や上皮からコクシジウムが認められ, 高率に *C. perfringens* が分離され, 大腸における強い病変が認められたことから, 急死に至った原因としては本菌によるものであると考えられる。一方, いずれにも相同性を示さない菌が分離された症例3では空腸リンパ節の腫大が高度であったことに加え, 腸炎病変が小腸に主座しており, *C. perfringens* が分離されなかったことや肝, 脾, 腎臓及び肺における血栓の多発像などの敗血症を疑う組織所見が認められたことから, 症例3ではいずれにも相同性を示さない菌が死亡の主たる原因菌であると考えられた。

本症例は37日齢及び40日齢で, 移行抗体と自己産生抗体が入り替わる時期であったこと, 各症例において同居する他の牛に同様の症状がみられず, 水平感染がなかったことから, *Mannheimia* 属菌が関与する腸炎の発症は, 胸腺の萎縮も認められたこともあり, 宿主側の免疫状態が大きく関与しているものと考えられた。

本症例は, *M. varigena* 及びいずれにも相同性を示さない菌が腸炎に関与していると推察したが, 症例1及び2ではコクシジウム, *C. perfringens* 及びコロナウイルス

表3 分離菌株の性状

検査方法	検査項目	パターン	
		-・小程	-・小程
生化学性状	カタラーゼ	+	+
	オキシダーゼ	+	+
	アラニンアミノペプチダーゼ	+	+
	フォスファターゼ	+	+
	硝酸塩還元	+	+
	ウレアーゼ	-	-
	オルニチン	-	-
	インドール	-	-
	グルコシダーゼ	-	-
	プロリンアミノペプチダーゼ	-	-
	グルタミンアミノペプチダーゼ	-	-
	糖分解	ブドウ糖	+
マルトース		+	+
フルクトース		+	+
マンノース		+	+
マンニトール		+	+
トレハロース		-	-
サッカロース		+	+
ラクトース		-	-
キシロース		+	+
β -ガラクトシダーゼ		+	+
亜硝酸還元		+	+
	β -ラクタマーゼ (β LA)	+	-
遺伝子解析	症例1 (<i>M.v</i>)		症例2 (<i>M.v</i>)
	症例3 (<i>Mannheimia</i> 属菌)		

+ : 陽性 - : 陰性 *M.v* : *Mannheimia varigena*

スが確認されていることから, これらの病原体の存在により *Mannheimia* 属菌が増殖し, 腸炎の重篤化に関与したと考える。

今回の報告に当たり, *Mannheimia haemolytica* の血清型別及び16S rRNA領域の塩基配列解析を実施していただいた(国研農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門病態研究領域の勝田 賢領域長補佐, 並びに病理組織検査における免疫組織化学染色を実施していただいた同部門ウイルス疫学研究領域の川島健司領域長補佐)に深謝する。

引用文献

- [1] Angen O, Mutters R, Caugant DA, Olsen JE, Bisgaard M: Taxonomic relationship 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 ruminialis* sp. nov., and *Mannheimia varigena* sp. nov., Int J Syst Bacteri-

- ol, 49, 67-86 (1999)
- [2] 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学, ウイルス学的, および病理組織学的調査, 獣医畜産新報, 61, 47-52 (2008)
- [3] 桜井健一, 松岡俊和, 鴻巣 泰, 飯島雄二, 成田和枝, 沖 三雄, 新井則雄, 漆畑憲二, 梅沢正親, 飯田 潔: 乳用牛で発生した *Pasteurella haemolytica* 感染症, 日獣会誌, 41, 731-734 (1988)
- [4] 須賀幸司, 西野 豊, 中島一郎, 御村宗人, 佐藤俊策, 後藤清次, 松岡俊和, 鴻巣 泰, 鉢須桂一, 飯島雄二, 成田和枝, 入江 壮: 肉用牛に集団発生した *Pasteurella haemolytica* 感染症とその防疫対策, 日獣会誌, 42, 319-323 (1989)
- [5] 富永 潔, 中澤宗生: 牛の *Pasteurella haemolytica* 感染症の病型と分離株の血清型, 日獣会誌, 45, 79-83 (1992)
- [6] 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)
- [7] 阿部祥次, 小池新平, 半田真明, 蓼沼綾子, 田中理栄子, 市川 優, 湯澤裕史: *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, 日獣会誌, 66, 248-251 (2013)
- [8] McLaughlin BG, Greer SC, Chengappa MM, Singh S, Maddux RL, Kadel WL, McLaughlin PS: Association of a *Pasteurella haemolytica*-like organism with enteritis in swine, J Vat Diagn Inves, 3, 324-332 (1999)

Enteritis in Calves Related to *Mannheimia varigena* and *Mannheimia* sp. Infections

Masako ICHIKAWA^{1)†}, Akihiro ISHIMOTO²⁾ and Yukiko ARAKI³⁾

- 1) Shiga Prefectural Livestock Hygiene Service Center, 226-1 Nishihongo, Omihachiman, 523-0813, Japan
- 2) Shiga Laboratory, NISSEI BILIS Co., Ltd., 555, Ukawa, Minakuchi, Koka, 528-0052, Japan
- 3) Okayama Prefectural Maniwa Livestock Hygiene Service Center, 1884-16 Katsuyama, Maniwa, 717-0013, Japan

SUMMARY

Three calves (37 to 40 days old) died acutely in Shiga Prefecture in 2005. During postmortem examinations characteristic findings were observed in all cases of swelling of the mesenteric lymph nodes. Histopathological examination revealed suppurative lesions in mucous membranes of the small intestine and the large intestine. *Mannheimia* (*M.*) *varigena* (*M. v*)-immunopositive antigens were detected in the mucous membrane of the intestines. *M. sp.* was isolated through bacteriological examination, and they was classified as *M. v* and unclassified as five species of *M. (M. sp.)* via 16S rRNA gene sequencing. *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, coronavirus, and coccidia were also isolated at that time. It was concluded that the enteritis was related to the *M. v* and *M. sp.* infections. — Key words: enteritis of calves, *Mannheimia* sp., *Mannheimia varigena*.

† Correspondence to: Masako ICHIKAWA (Shiga Prefecture Livestock Hygiene Service Center)
226-1 Nishihongo, Omihachiman, 523-0813, Japan

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 69, 731~736 (2016)