

第 2 部

牛コロナウイルスによる搾乳牛の集団下痢発生事例

東部家畜保健衛生所 小林洋平・小泉伊津夫ほか

概要

牛コロナウイルス（以下 BCV）病は、下痢を主徴とする急性疾病で、特に乳牛では重度の乳量低下を起し経済的被害が大きい。平成 25 年 4 月下旬、管内乳用牛農場において BCV による牛群内の下痢蔓延、乳量低下が認められる事例が発生した。当農場は乳用牛 30 頭（成牛 22 頭、育成牛 8 頭、対尻式スタンションストール方式、BCV ワクチン未接種）を飼養、平成 25 年 4 月 24 日、搾乳牛 1 頭に水様性下痢が発症、その後次々に下痢を呈する個体が増加し、鮮血混入下痢便を呈する個体も確認された（図 1）。出荷乳量は初発確認日より減少し、一頭当たりの平均出荷乳量は下痢発生前の約 29kg/頭から 21kg/頭まで減少した（図 2）。下痢は牛群全体へと蔓延し、5 月 1 日に病性鑑定を実施、BCV による集団下痢及び乳量低下と診断した。当農場において過去数年間にわたり今回のような大規模な下痢の流行や乳量低下は確認されておらず、また近隣に牛飼養農家はなく直近での導入牛もないことから今回の発生要因について考察を行ったので病性鑑定結果と併せて報告する。

農場概要

- 形態: 酪農(対尻式、スタンションストール方式)
- 飼養頭数: 成牛22頭、育成牛8頭
- 疫学等: 導入なし、BCVワクチン接種歴なし

発生経過

- H25.4.24 水様性下痢1頭発症
- その後、次々に下痢・血便牛が増加




図 1

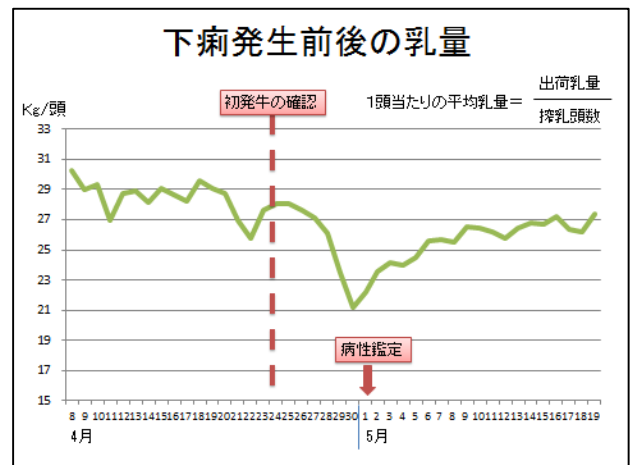


図 2

材料と方法

1) 病性鑑定

下痢発症牛 9 頭の下痢便、鼻腔スワブ、血清（pre/post）及び採材時未発症同居牛 1 頭の血清（pre/post）を採材した（図 3）。ウイルス学的検査（遺伝子検索：BCV, GAR, GBR, GCR, BToro、PCR-制限酵素断片長多型（RFLP）法：Ava^I, Eco065^I、BCV 抗体検査：赤血球凝集抑制試験（HI 試験）、細菌学的検査（DHL 及び Escherichia coli 寒天培地による好気培養、抗酸菌染色）、寄生虫学的検査（飽和食塩水による浮遊法）を実施した。

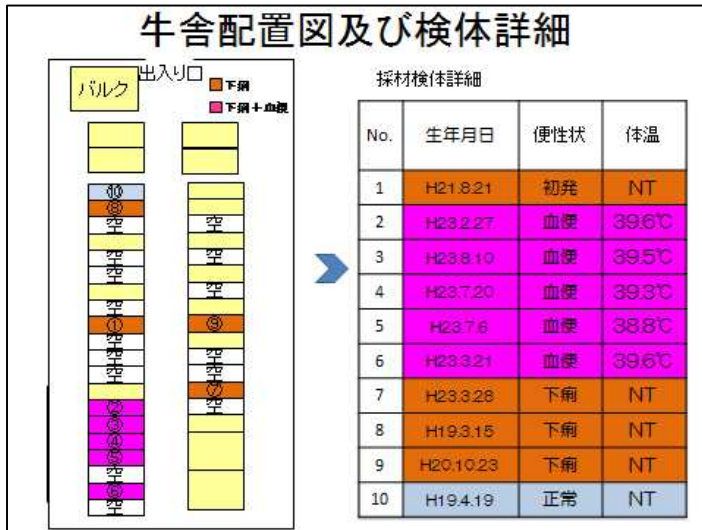


図 3

2) 発生要因考察のための調査

環境要因

初発確認日の前後 2 週間における県内 2 地点の平均気温の推移を調査。

発生時及び過去の牛群構成、BCV 抗体価の比較

当農場の定期検査保存血清(平成 21 年度、23 年度)を用いて BCV 抗体検査(HI 試験)を実施、年齢別の抗体保有状況を発生時と比較。

発生 6 ヶ月後の発症牛及び流行未経験牛の抗体調査

発生 6 ヶ月後に発症牛及び発生後に誕生した流行未経験牛の BCV 抗体検査(HI 試験)を実施。

結果

1) 病性鑑定

糞便全検体及び 7 頭の鼻腔スワブより BCV 特異遺伝子を検出(図 4)。検出した BCV 特異遺伝子について制限酵素(Ava、Eco065)を用いた PCR-RFLP 法にて型別を実施したところ、全て遺伝子型 4 と判定(図 5)。BCV 抗体検査では 10 頭中 7 頭で BCV 抗体価の有意な上昇を確認。細菌学的検査及び寄生虫学的検査陰性。以上の結果から BCV 感染による集団下痢と診断した。

病性鑑定結果(1)

No.	生年月日	便性状	RT-PCR					BCV HI-抗体価		
			BCV		GAR	GBR	GCR	BToV	発症期	回復期
			糞便	鼻腔スワブ						
1	H21.8.21	初発	+	-	-	-	-	160	320	
2	H23.2.27	血便	+	+	-	-	-	80	320	
3	H23.8.10	血便	+	+	-	-	-	10	320	
4	H23.7.20	血便	+	+	-	-	-	40	320	
5	H23.7.6	血便	+	+	-	-	-	<10	160	
6	H23.3.21	血便	+	+	-	-	-	<10	1280	
7	H23.3.28	下痢	+	-	-	-	-	40	320	
8	H19.3.15	下痢	+	+	-	-	-	640	640	
9	H20.10.23	下痢	+	+	-	-	-	320	640	
10	H19.4.19	正常	NT	NT	NT	NT	NT	160	640	

細菌学的検査: 有意菌分離陰性 寄生虫検査: 虫卵未検出

図 4



図 5

2) 発生要因考察のための調査

環境要因

初発確認日（4月24日）から4～5日前に県内2地点において平均気温10以上の急激な気温の低下を確認した（図6）。

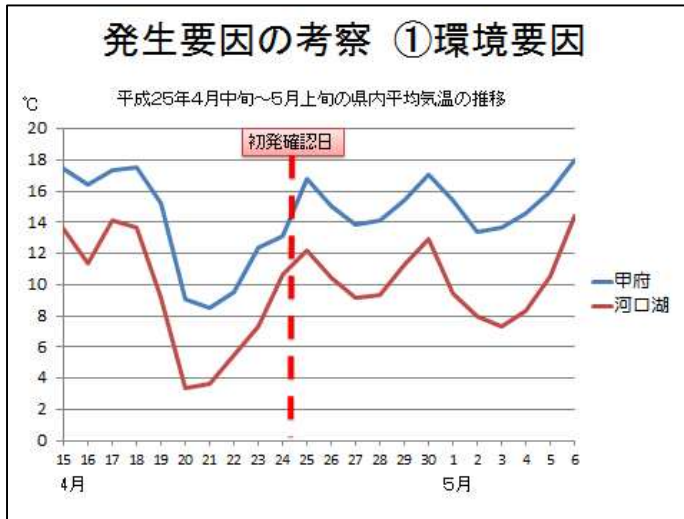


図 6

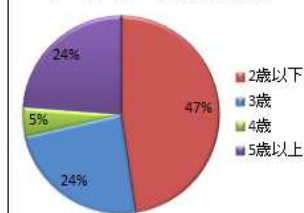
発生時及び過去の牛群構成、BCV 抗体価の比較

発生時の牛群構成は2歳以下の若齢牛が多く、全体の47%を占めていた。また、病性鑑定結果から2歳以下の個体はpre血清時の抗体価が低値であり、若齢牛が群の半数近くを占めていたことで牛群全体の抗体価が低下していたと推察（図7）。保存血清を用いた抗体検査においても若齢牛は抗体価が低い傾向にあり、平成23年度は本年と同様に若齢牛の割合が高く群としての抗体価は低下していた（図8）。

発生要因の考察 ②発生時の牛群

病性鑑定採材10頭の年齢と抗体価					
No.	状態	生年月日	年齢	BCV HI-抗体価	発症期 回復期
1	初発	H21.8.21	3	160	320
2	血便	H23.2.27	2	80	320
3	血便	H23.8.10	1	10	320
4	血便	H23.7.20	1	10	320
5	血便	H23.7.8	1	<10	160
6	血便	H23.3.21	2	<10	1280
7	下痢	H23.3.28	2	10	320
8	下痢	H19.3.15	6	640	640
9	下痢	H20.10.23	4	320	640
10	正常	H18.4.19	6	160	640

・発生時における牛群全体年齢別構成

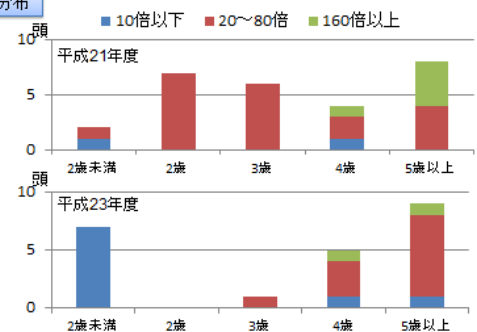


若齢牛（平成23年生まれ・2歳）は低い抗体価。若齢牛の占める割合が多くなり、牛群全体の抗体価が低下していた。

図 7

～保存血清（平成21、23年）抗体保有状況調査～

年齢別抗体価分布



・若齢牛（2歳未満）では抗体価が低い個体が多い
・平成23年度も本年同様若齢牛の割合が多く、群としてのGM値も低い状態。

図 8

発生6ヶ月後の発症牛及び未経験牛抗体調査

流行経験牛は発生6ヶ月後も80～640倍の抗体価を保有していた。発生後に誕生した流行未経験牛の抗体価は10倍未満であった。

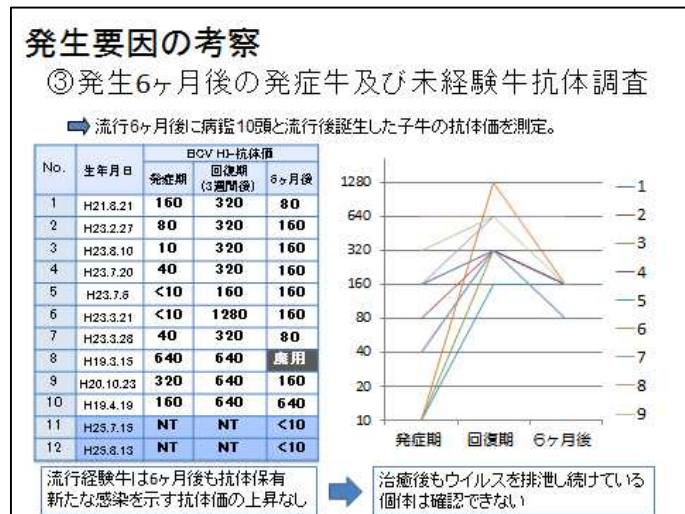


図 9

考察

病性鑑定結果から近年全国で発生が確認されている遺伝子型4のBCV感染による下痢及び乳量低下と診断した。発生要因としては牛群内に若齢牛が増加しBCV抗体価が群として低下していたことで大きな被害となったと推察した。しかしながら、過去血清を用いた調査においても同様に若齢牛が多くGM値が低下していたが大きな発生や被害は確認されていなかったことから、今回の発生要因として若齢牛が多く群のGM値が低下していたことに加え、発生前に気温の急激な低下があったことから、寒冷ストレスが発生誘因になったと考察した。また感染経路についても検討を行ったところ、当該農場では近隣に牛飼養農家もなく導入牛もいないことから外部からウイルスが侵入した可能性は低く、3歳以上の個体では発症時より既にBCV抗体を保有していることから、農場内にBCVが常在化している可能性が高いと考えられるが、今回発生6ヶ月後にBCV抗体価を調査した結果、流行後に誕生した牛については抗体を保有しておらず、流行後も持続してウイルスを排泄している個体は確認できなかった。今後も流行未経験牛について定期的に抗体価を測定することで農場内でのウイルスの動態を把握していくとともに流行経験牛についても抗体消失時期について調査していきたい。

一般にBCVによる集団下痢が発生した牛群では半年から2～3年間は再発生はみられないとされ、本症例においても流行経験牛は半年後も80倍以上の抗体価を保有していたが、今後牛群の更新が進むと流行未経験牛が増加し、再び群の抗体価が低下し再発生するリスクが高まるため、対策として若齢牛を中心としたワクチン接種について検討していく必要がある。

管内酪農家における緑膿菌性乳房炎の続発例

東部家畜保健衛生所 牛山市忠・小泉伊津夫ほか

1、はじめに

緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* (以下 Pa) は、水まわりなどの生活環境に広く常在しており、家畜にとっては日和見細菌の一つであるが¹⁾、エンドトキシンを産生するため、何らかの原因で血液中に侵入すると菌血症や敗血症を引き起こすことがある。また、Pa は生体内や環境中においてバイオフィーム形成能が高く、固体表面に付着定着し菌体外マトリクスによりバイオフィームを形成すると殺菌剤や抗生物質に対して抵抗性を示すと言われている²⁾。

乳牛での Pa 乳房炎については、臨床症状は様々で急性から慢性再発性などであるが、一般的に治療効果が低く淘汰が推奨されている³⁾。

今年度、管内酪農家で乾乳牛 4 頭、泌乳牛 2 頭で Pa 乳房炎が発生、対策を実施しあわせて菌株の性状解析も実施したので報告する。

2、農場の概要

発生農場は乳用牛約 60 頭、その他肉用牛約 10 頭を飼養。飼育形態はフリーストール牛舎で、搾乳方法はパイプミルクカーとバケットミルクカーを使用。出荷用の牛乳については、パイプミルクカーを用いて搾乳。分娩後の初乳など出荷に不適な牛乳については、バケットミルクカーを使用して搾乳していた。

当該農場の乾乳方法は急速乾乳法(一発乾乳法)で実施しており、具体的な方法としては PL テスターで乳房炎の無いことを確認後、アルコールによる乳頭消毒を実施し、セフェム系の抗生物質乳房炎軟膏を注入、濃厚飼料(TMR)給与を止めるという手順で実施していた。畜主は十数年、このような方法で乾乳を実施しており、これまでのところ乾乳時のトラブル等はなかった。

3、発生状況および経過

乾乳牛による発生：乾乳軟膏を入れた直後に Pa 乳房炎が発生(図1)

平成25年6月乾乳軟膏を入れた直後に甚急性乳房炎で死亡した個体が発生。共済獣医師より病性鑑定依頼があり、当所にて乳汁より Pa を分離した。また、7月にも同様に乾乳軟膏を入れた直後の3頭が乳房炎(内2頭は死亡、1頭は回復)となり当所で Pa を分離した。

泌乳牛による発生：バケットミルクカー使用直後に Pa 乳房炎が発生(図2)

平成25年8月に分娩した牛が搾乳にバケットミルクカーを使用したところ、翌日 Pa による甚急性乳房炎で1頭死亡。また、10月にもバケットミルクカーを使用した個体で、乳房炎となり廃用となった個体が1頭確認され、乳汁について当所で Pa を分離した。

なお、6、7月に Pa 乳房炎となった個体については、泌乳期においてバケットミルクカーによる搾乳は実施しておらず、との直接的な関連は確認されなかった。

<p>図1</p> <p style="text-align: center;">発生状況①:乾乳牛</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>連番</th> <th>乳期</th> <th>実告</th> <th>転帰</th> <th>検査結果 (cfu/ml)</th> <th>採材日</th> <th>微生物</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>乾乳</td> <td>6/15乾乳飲香</td> <td>死亡 6/16</td> <td>Pa</td> <td>6/17</td> <td></td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>乾乳</td> <td>7/1乾乳飲香</td> <td>死亡 7/4</td> <td>Pa*</td> <td></td> <td>7/2,3: CEZ</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>乾乳</td> <td>7/18乾乳飲香</td> <td>死亡 7/21</td> <td>Pa 1×10⁶ E.coli 1×10⁶</td> <td>7/19</td> <td>7/19: ERFX, OTC</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>乾乳</td> <td>7/19乾乳飲香</td> <td>劇重</td> <td>Pa 1×10⁷ E.coli 2×10</td> <td>7/19</td> <td>7/19: ERFX</td> </tr> </tbody> </table> <p>※すべてで、乳房の腫脹および沈黙、発熱などの症状 *：当所では検査未実施、NOSAIで検査</p> <p>○ 乾乳軟膏を入れた直後に甚急性乳房炎を発生 ○ すべての個体でPaを分離</p>						連番	乳期	実告	転帰	検査結果 (cfu/ml)	採材日	微生物	1	乾乳	6/15乾乳飲香	死亡 6/16	Pa	6/17		2	乾乳	7/1乾乳飲香	死亡 7/4	Pa*		7/2,3: CEZ	3	乾乳	7/18乾乳飲香	死亡 7/21	Pa 1×10 ⁶ E.coli 1×10 ⁶	7/19	7/19: ERFX, OTC	4	乾乳	7/19乾乳飲香	劇重	Pa 1×10 ⁷ E.coli 2×10	7/19	7/19: ERFX	<p>図2</p> <p style="text-align: center;">発生状況②続発:泌乳牛</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>連番</th> <th>乳期</th> <th>実告</th> <th>転帰</th> <th>検査結果 (cfu/ml)</th> <th>採材日</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5</td> <td>泌乳</td> <td>8/21分焼 バケツミルク一搾乳</td> <td>死亡 8/22</td> <td>Pa > 1×10⁷</td> <td>8/22</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>泌乳</td> <td>10/6分焼 バケツミルク一搾乳</td> <td>廃用 10/9</td> <td>Pa 1×10⁵</td> <td>10/7</td> </tr> </tbody> </table> <p>※すべてで、乳房の腫脹および沈黙、発熱などの症状</p> <p>○ バケツミルクを使用した直後に甚急性乳房炎を発生 ○ すべての個体でPaを分離</p>						連番	乳期	実告	転帰	検査結果 (cfu/ml)	採材日	5	泌乳	8/21分焼 バケツミルク一搾乳	死亡 8/22	Pa > 1×10 ⁷	8/22	6	泌乳	10/6分焼 バケツミルク一搾乳	廃用 10/9	Pa 1×10 ⁵	10/7
連番	乳期	実告	転帰	検査結果 (cfu/ml)	採材日	微生物																																																										
1	乾乳	6/15乾乳飲香	死亡 6/16	Pa	6/17																																																											
2	乾乳	7/1乾乳飲香	死亡 7/4	Pa*		7/2,3: CEZ																																																										
3	乾乳	7/18乾乳飲香	死亡 7/21	Pa 1×10 ⁶ E.coli 1×10 ⁶	7/19	7/19: ERFX, OTC																																																										
4	乾乳	7/19乾乳飲香	劇重	Pa 1×10 ⁷ E.coli 2×10	7/19	7/19: ERFX																																																										
連番	乳期	実告	転帰	検査結果 (cfu/ml)	採材日																																																											
5	泌乳	8/21分焼 バケツミルク一搾乳	死亡 8/22	Pa > 1×10 ⁷	8/22																																																											
6	泌乳	10/6分焼 バケツミルク一搾乳	廃用 10/9	Pa 1×10 ⁵	10/7																																																											

4、環境調査

Paによる乳房炎の続発が続いたため、当所にて10月に農場環境調査を実施した。牛舎、バケツミルクやバルク乳について15検体採材(採材風景:図3)するとともに、バケツミルクの洗浄方法の確認を行った。

方法：検体は綿棒で採取後、ミューラーヒントンブロスで42 24時間好気培養後、セトリミド寒天基礎培地(日本BD)にて37 24時間培養し、分離された菌についてAPI20NEおよびPCR検査⁴⁾にて同定した。

結果：バケツのホースおよびミルクローからPaを検出した(図4)。

また、バケツ洗浄方法は搾乳前に中性洗剤で洗浄し、搾乳後に塩化アルカリ材で洗浄するという方法であった。ホースなどに不適な泡切れの悪い中性洗剤を使用しているのに加えて、一般的に乳石除去の目的で使用されるべき酸剤を使用していなかった。そのため、チューブ内などは洗浄消毒が不十分で白色で乳石のようなものが沈着していた。

<p>図3</p> <p>採材場所(主にPaが確認された場所:バケツミルク)</p> 		<p>図4</p> <p style="text-align: center;">結果</p> <p style="text-align: right;">○:検出 - :不検出</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">No</th> <th rowspan="2">採材場所</th> <th colspan="2">分類</th> </tr> <tr> <th>直接培養</th> <th>増菌培養</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>バケツライン4本</td> <td>-</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>バケツミルクロー-撻合および内部</td> <td>-</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>バケツミルクロー-とホース撻合部</td> <td>-</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>バケツホース内部</td> <td>-</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>バケツ缶内部</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>パイプライン ライナー内部</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>タオル消毒液</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>レリーザー内部</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>アルカリ水</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>ホースジョイント口および撻口</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>ホース撻口</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>12</td> <td>パンクリ清</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>13</td> <td>バケツミルク内部</td> <td>○</td> <td>○</td> </tr> <tr> <td>14</td> <td>牛乳処理室の水</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>バルク乳</td> <td>-</td> <td>-</td> </tr> </tbody> </table> <p>バケツミルクの洗浄方法 中性洗剤→搾乳→塩化アルカリ撻料※矢印部分ですすぎ ホースやバケツミルクロー、撻内部に乳石が沈着</p>		No	採材場所	分類		直接培養	増菌培養	1	バケツライン4本	-	○	2	バケツミルクロー-撻合および内部	-	○	3	バケツミルクロー-とホース撻合部	-	○	4	バケツホース内部	-	○	5	バケツ缶内部	-	-	6	パイプライン ライナー内部	-	-	7	タオル消毒液	-	-	8	レリーザー内部	-	-	9	アルカリ水	-	-	10	ホースジョイント口および撻口	-	-	11	ホース撻口	-	-	12	パンクリ清	-	-	13	バケツミルク内部	○	○	14	牛乳処理室の水	-	-	15	バルク乳	-	-
No	採材場所	分類																																																																			
		直接培養	増菌培養																																																																		
1	バケツライン4本	-	○																																																																		
2	バケツミルクロー-撻合および内部	-	○																																																																		
3	バケツミルクロー-とホース撻合部	-	○																																																																		
4	バケツホース内部	-	○																																																																		
5	バケツ缶内部	-	-																																																																		
6	パイプライン ライナー内部	-	-																																																																		
7	タオル消毒液	-	-																																																																		
8	レリーザー内部	-	-																																																																		
9	アルカリ水	-	-																																																																		
10	ホースジョイント口および撻口	-	-																																																																		
11	ホース撻口	-	-																																																																		
12	パンクリ清	-	-																																																																		
13	バケツミルク内部	○	○																																																																		
14	牛乳処理室の水	-	-																																																																		
15	バルク乳	-	-																																																																		

5, 疫学関連調査

乳房炎個体から分離した Pa とバケツから分離した Pa について PFGE (切断酵素: Spe) 検査および薬剤感受性試験を実施した。材料および方法は以下のとおりであった。

材料: 分離株 10 株

内訳 (乾乳牛由来 3 株、泌乳牛由来 2 株、バケツミルク由来 3 株
他農場 1 株、標準株 ATCC27853 1 株)

方法: 制限酵素 Spe を用いた PFGE

一濃度ディスク法を用いた薬剤感受性試験 (10 薬剤)

ペニシリン系: ABPC、マクロライド系: EM、アミノグリコシド系: GM, AMK

セファロスポリン系: CEZ、テトラサイクリン系: TC、キノロン系: ERFX, CPFX

その他合成剤: ST、カルバペネム系: IMP

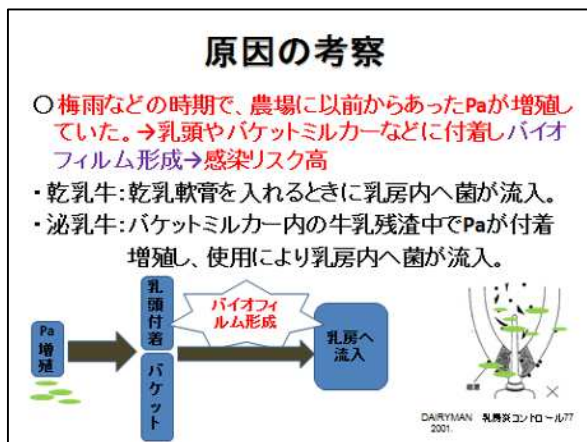
* ABPC、EM、CEZ: 一般的に Pa に耐性、AMK、CPFX、IMP: 人で多剤耐性菌の指標

結果



PFGE (図 5) については、標準株 を基準にすると乾乳牛由来 3 株 (①、②、③) と泌乳牛由来 2 株 (④、⑤)、バケツ由来 2 株 (⑥、⑦) は、ほぼ同様の切断パターンであり、近縁な株であると考えられた。また、薬剤感受性試験 (図 6) では標準株 (⑩) に比べると TC について耐性が認められ、人で問題となる多剤耐性菌は確認されなかった。また使用乳房炎軟膏の主成分である CEZ については耐性であり、一般的に Pa に感受性のあるとされる ERFX、GM については、今回の検査でも感受性であった。

6, 原因の考察



疫学関連調査により Pa 感染症の株は、乾乳牛・泌乳牛・バケット由来で近縁な株であることが示唆された。このことより、6月の梅雨などの時期で農場に以前からあった環境中の Pa が増殖し、今回の乾乳牛・泌乳牛における乳房炎の原因となったものと推測した。具体的には、環境中で増殖した Pa が、乳頭や洗浄不良であったバケットミルカーなどに付着し、さらに Pa に特徴的なバイオフィルムを形成していたものと推測。乾乳牛については乾乳軟膏を入れるときに、泌乳牛についてはバケットミルカーを使用時に乳房内へ Pa を押し込んでしまい、体内で増殖しエンドトキシンショックを引き起こしたものと考察した。

指導および変更点

内容	前	後
乾乳方法	急速乾乳法	漸減乾乳法
乾乳軟膏	使用	使用しない
バケットミルカーの洗浄方法	手洗い	自動洗浄
その他		部品の交換
バケットミルカー消毒方法	塩化アルカリ剤 中性洗剤	塩化アルカリ剤、酸剤 塩素剤

11月:バケットミルカー確認検査でPa分離されていない

バケットミルカーについては、乳石の付着したホースや蓋部分の消耗品の交換を行うとともに、これまでの泡切れの悪くチューブなどの洗浄に不適な中性洗剤を用いた消毒方法から塩素化アルカリ、酸、塩素による自動洗浄システムによる消毒方法(搾乳前の塩素殺菌 搾乳 すすぎ 塩素化アルカリ すすぎ 酸 すすぎ 塩素による殺菌)に変更した。11月にバケットミルカーについて確認検査を実施したところ、Pa は分離されなくなった。

8, まとめ

平成 25 年 6、7月に乾乳実施直後の乾乳牛 4 頭および 8、10月に分娩後バケットミルカーを使用した直後の泌乳牛 2 頭が Pa 感染牛となりました。この Pa 感染牛 6 頭中 5 頭が死亡または淘汰となり、今回の Pa 乳房炎の感染は農場にとって経営的にも甚大な被

疫学関連調査により Pa 感染症の株は、乾乳牛・泌乳牛・バケット由来で近縁な株であることが示唆された。このことより、6月の梅雨などの時期で農場に以前からあった環境中の Pa が増殖し、今回の乾乳牛・泌乳牛における乳房炎の原因となったものと推測した。

具体的には、環境中で増殖した Pa が、乳頭や洗浄不良であったバケットミルカーなどに付着し、さらに Pa に特徴的

7, 指導および確認検査

今回の Pa 乳房炎発生の特徴として、乾乳軟膏を入れた直後およびバケットミルカーを使用した直後という特徴が認められた。今回の発生前後での変更点を左図で示す。

まず、乾乳時の Pa 感染が疑われたため、これまでの急速乾乳法から、乾乳軟膏を使用せず、さらに TMR を減らして乾乳する方法(漸減乾乳法)に乾乳方法を変更。次にバケットミ

害となった。その後、当所にて環境調査を実施したところ、バケツミルカーより Pa を分離し、さらに疫学関連調査を実施したところ農場のバケツから分離した Pa 株と Pa 乳房炎株で PFGE および薬剤耐性試験で同一パターンが示された。

このことより、環境中には農場に以前からあった Pa が農場全体に増殖していたものと考え、乾乳牛については乾乳軟膏を入れるときに、泌乳牛についてはバケツミルカー使用時に Pa 乳房炎を引き起こしたと推測。対策として、乾乳方法や洗浄方法の変更を実施したところ、当該農場での Pa 続発は認められなくなった。

今後は、梅雨の時期などは Pa が増殖しやすいことなどを考慮して、乾乳方法やバケツなどの洗浄方法について県内の酪農家へ注意喚起していきたいと考えている。

今回の発表にあたり山梨県農業共済連合会の岡本達也先生、諏訪森大先生に深謝致します。

参考文献

- 1) Radostitis, O.M., D.C. Blood, and C.C. Gay. 1994. Veterinary medicine, 8th ed., p.598. Bailliere Tindall, London, England
- 2) *Pseudomonas aeruginosa* のバイオフィルム形成と抗菌薬抵抗性に関与する遺伝子ネットワーク：日本細菌学雑誌 67(2)：227-243, 2012
- 3) 酪農家と獣医師による牛の乳房炎コントロール：チクサン出版社
- 4) PCR-Based Assay for Differentiation of *Pseudomonas aeruginosa* from other *Pseudomonas* Species Recovered from Cystic Fibrosis Patients：J, Clin. Microbiol. 2004, 42(5)：2074

Eimeria 属の種鑑別におけるリアルタイム PCR (rPCR) の活用

東部家畜保健衛生所

秋山倫子・小泉伊津夫ほか

【はじめに】

鶏コクシジウム病は、*Eimeria* 属原虫の寄生により起こる鶏の腸炎で、現在 9 種類の *Eimeria* 属原虫が報告されている。このうち、野外で問題となるといわれているのが、*E. acervulina* (Ea)、*E. brunetti* (Eb)、*E. maxima* (Ema)、*E. necatrix* (En)、*E. tenella* (Et) の 5 種が主体で、近年 *E. mitis* (Emi) も増えてきているという説もある。*Eimeria* 属の種鑑別は、糞便検査によるオーシストの形状や、病理組織検査における寄生部位・病像により判断されている。しかし、野外での単独感染は稀で、これらの方法で鑑別するのは非常に困難である。そこで今回、県内で鶏コクシジウム病と診断した 4 症例の、ホルマリン固定パラフィン包埋組織切片 (FFPE サンプル)、腸内容物、鶏舎内落下糞などについて、新たに rPCR を用いて種鑑別を試み、従来検査結果と併せて比較検討したので報告する。

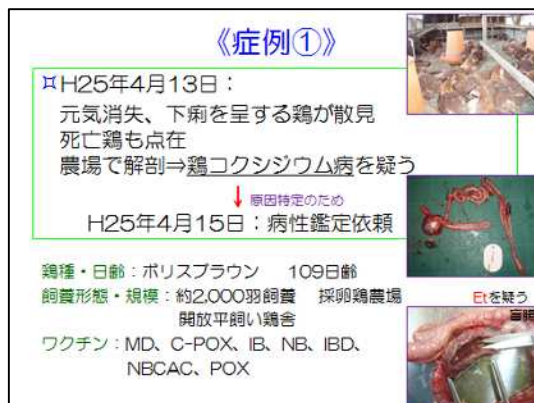
【症例概要】

症例

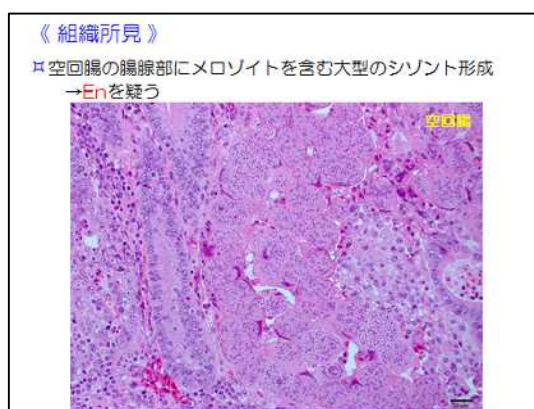
約 2,000 羽飼養の開放平飼い採卵鶏農場。ボリスブラウン、109 日齢。下痢を呈し元気消失している鶏が散見とのことで通報があり、病性鑑定を実施した。解剖で、盲腸膨大部が腫脹し暗赤色を呈しており、切開すると粘膜は肥厚し出血が認められた。中には乾酪様物を有しており Et を疑った【図 1】。病理組織検査で、空回腸の腸腺部にメロゾイトを含む大型のシizont を認め、En を疑った【図 2】。

症例

約 15,000 羽飼養の開放ケージ飼い採卵鶏農場。ソニア、143 日齢。死亡鶏増加との通報があり農場へ立ち入り、状況から熱中症が疑われたが、詳細検査のため病性鑑



【図 1】



【図 2】



【図 3】

定依頼があった事例。病理組織検査で、十二指腸の粘膜上皮細胞内に軽度から中程度のコクシジウムが寄生しており、Ea を疑った【図3】。

症例

約2,000羽飼養の農場。開放平飼い鶏舎で飼養された、シャモ 89日齢。死亡鶏増加との通報があり、病性鑑定を実施した。解剖で、盲腸内にコアの形成を認めEtを疑った【図4】。病理組織検査で、十二指腸の粘膜上皮細胞内の表層側に、重度のコクシジウム寄生を認めEaを疑った【図5】。

症例

100羽飼養の開放平飼い採卵鶏農場。岡崎おうはん、約200日齢。元気消失、産卵低下との通報があり、農場へ立ち入り。立ち入り時に下痢便を発見し、鶏コクシジウム病を疑い検査を実施した【図6】。

【材料と方法】

rPCRの材料には、「FFPEサンプル」、「腸内容物」、「鶏舎内落下糞」を用いた。

「FFPEサンプル」は、腸全域が含まれるパラフィン包埋ブロックを用い、5μm前後の厚さの切片を3~5枚準備。それらを市販キット(QIAGEN社)を用いDNA抽出。

「腸内容物」は、十二指腸から結腸までの内容物を均一に採取し、PBSを加え100メッシュの金網でこし、均一糞液を作製。「鶏舎内落下糞」は、鶏舎内の複数力所から盲腸便を含む数羽分の落下糞を採取。腸内容物と同様の方法で均一糞液を作製。これらの均一糞液を市販キット市販キット(FASMACH社)をもちいてDNA抽出。この抽出では、ビーズ式粉碎により、硬いオースト壁を物理的に破壊した。

これらの抽出したDNAについて、rPCRを実施した。プライマーや条件等は、川原らの文献(AVIAN DISEASES 52: 652-656, 2008)を参考にした。

《症例③》

H25年9月30日:
死亡鶏の増加
沈鬱、食欲不振、軟便を呈する鶏が多数

↓原因特定のため

病性鑑定依頼: 6羽(生体3、死体3)

鶏種・日齢: シャモ 89日齢
飼養形態・規模: 約2,000羽飼養 卵内種鶏農場
開放平飼い・ケージ飼い鶏舎
当該症例→開放平飼い鶏舎

ワクチン: MD, F.pox, ND, NB
OPG: 10⁴~10⁷個

【図4】

《組織所見》

H25年9月30日:
十二指腸の粘膜上皮細胞内の表層側に重度コクシジウム寄生
→Eaを疑う

【図5】

《症例④》

H25年9月30日:
元気消失している鶏が増加し、産卵率が低下
死亡鶏はなく、解剖未実施
農場立ち入り時に下痢を発見
→ 鶏コクシジウム病を疑う

↓確認のため

鶏舎内落下糞(数羽分プール)を検査

鶏種・日齢: 岡崎おうはん 約200日齢
飼養形態・規模: 100羽飼養 採卵鶏農場
開放平飼い鶏舎

OPG: 10⁷個

【図6】

【結果】

症例 【図7】

図中の右グラフは rPCR の結果。上が腸内容物で、下が FFPE サンプル。左表は、従来どおりの検査で疑ったものと、rPCR の結果を併せまとめたもの。Et、En、Emi、Ea、*E. praecox* (Ep) の寄生が明らかになった。グラフの横軸はサイクル数で、早く立ち上がったものは遺伝子量が多いと判断し、立ち上がりの順序を数字で表に示した。また、量が多ければそれだけ病態に与える影響は大きいものと判断し、それらを有意種とした。従来どおりの検査での疑ったものと rPCR が示す有意種は同種であった。

症例 【図8】

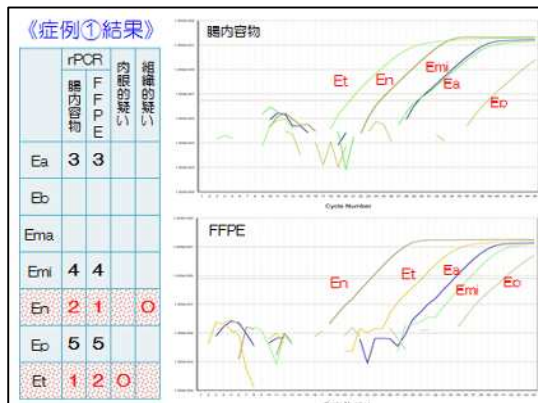
Et、Ea、Ep、*E. brunetti* (Eb) が寄生していた。この症例では、組織的に疑うことができなかった、Et が有意種であることがわかった。

症例 【図9】

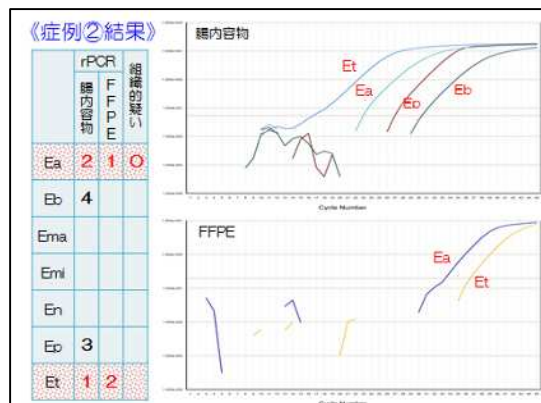
この症例は腸内容物、FFPE サンプルに加え、鶏舎内落下糞についても検査を実施した。Et、Ea、Emi、Ep、En の寄生が確認され、そのうち Et、Ea、Emi が有意種で、3材料ともほぼ同様の結果を示した。この症例でも、従来検査では疑うことができなかった Emi が有意種と示された。

症例 【図10】

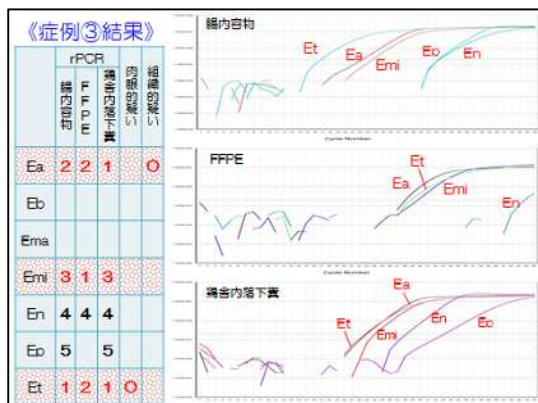
この症例は、死亡する個体がおらず、鶏舎内落下糞のみで検査を実施した。Ea、Emi が影響を及ぼしているものと考えられた。



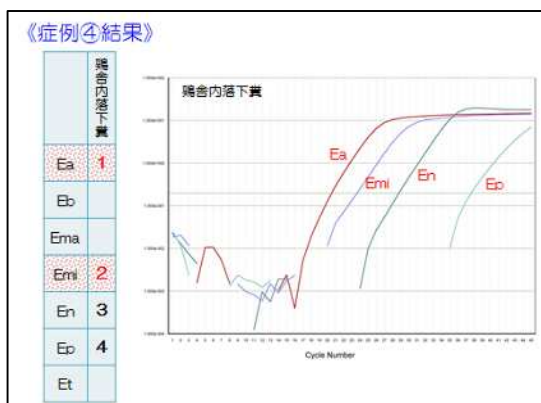
【図7】



【図8】



【図9】



【図10】

【まとめ】

症例 から では、複数種の混合感染であった。FFPE サンプル、腸内容物、鶏舎内落下糞では、多少の違いはあるものの、概ね同様の検出結果を示した。このことから、FFPE サンプル、腸内容物、鶏舎内落下糞のいずれを検査材料に用いても、鶏群における *Eimeria* 属の浸潤状況が把握可能であることがわかった。FFPE サンプルは、あまり実用的ではないものの、過去の農場内の浸潤状況を遡ったり、生材料がない場合にも検査可能で、鶏舎内落下糞は、症例 の様に解剖することなく検査可能など、それぞれ利点があると考えられる。

現在、国内で販売されている鶏コクシジウム病のワクチンは、「日生研鶏コクシ弱毒3価生ワクチン(TAM)」、¹⁾「日生研鶏コクシ弱毒生ワクチン(Neca)」、²⁾「パラコックス-5」の3種類の生ワクチンであるが、それぞれ、ターゲットにしている種が異なるため、ワクチンに含まれていない種が感染した場合、病原性発現を抑えることはできない【図11】。

今回、従来通りの検査で疑うことができなかった種が、rPCR によって有意種と判定されるケースもあったことから、従来の糞便検査や病理検査に、今回の rPCR を追加することで、より適切なワクチンの選定など飼養衛生指導に有用であると考えられた。

《まとめ》

国内で市販されているワクチン（生ワクチン）

- 日生研鶏コクシ弱毒3価生ワクチン（TAM）
… 【Et, Ea, Ema】
- 日生研鶏コクシ弱毒生ワクチン（Neca） …… 【En】
- パラコックス-5 …… 【Ea, Ema (2株)、Emi, Et】

※ワクチンに含まれない種が感染した場合、病原性は抑えられない

✕ 従来検査で疑うことができなかった種が
rPCRにより有意種と判定されるケースもあった。

↓

従来検査に、rPCRを追加することで、より
適切なワクチンの選定など飼養衛生指導に有用。

【図11】