

## 第 2 部

## A農場牛から分離されたヨーネ菌に対する殺菌効果試験成績

西部家畜保健衛生所

○深澤矢利 岸田諭俊

### 1 概要

平成 28 年～今年度にかけて、県内で相次いでヨーネ病の発生が確認された。発生農場での検査やまん延防止等防疫措置に際し、消毒は最も重要な作業である。しかし、ヨーネ菌に対して効果の高い薬剤や熱抵抗性についての情報が少ない。そこで、主要な消毒剤と温度感作による殺菌効果について検討した。

### 2 材料と方法

管内A酪農家から分離されたヨーネ菌に対して、主要な消毒剤（商品名「クリアキル」、「クレンテ」、「4%炭酸ソーダ」、「ビルコン」、「消石灰」）、消毒用アルコールの感作及び温度感作（63℃15分～90℃5分まで8段階）を行い、7H10MEY培地に接種、4か月後の発育コロニーの有無により殺菌効果を判定した。

なお、消毒剤は水道水で所定の希釈を行った。クリアキルについては水道水に加え、NaOH及び消石灰をそれぞれ0.1%(B/W)、0.5%(B/W)に調製した液で希釈した。

併せて各種薬剤について1%牛糞混入及び低温(氷水中)下の効果への影響を調査した。

### 供試消毒薬

種類	商品名	成分	希釈列 (倍)	pH (希釈倍)
逆性石鹼	クリアキル-100	塩化ジテシルジメチルアンモニウム	400 800 1600	7.65(×100)
	// NaOH 0.1%加	// (NaOH)		12.3(×100)
	// 消石灰 0.5%加	// (消石灰)		12.9(×100)
塩素系	クレンテ	ジクロロイソシアヌ酸ナトリウム	1600	5.6(×100)
複合剤	ビルコンS	ペルオキ硫酸水素カルウム		2.1(×100)
その他	炭酸ソーダ	4%炭酸ナトリウム	25	11.6(×25)
	消石灰	水酸化カルシウム	10,20	12.4(×10)
	消毒用エタノール	76.9～81.4%エタノール		

希釈液：水道水（pH7.35）及び1%牛糞加水道水

### 方法

○消毒薬感作試験（室温 22℃）

(1) 各種薬剤の段階希釈液（2ml）に菌液 20 $\mu$ l 混和

菌液：4×10<sup>5</sup>CFU/ml（1/10濃度 BHI）

(2) 1分, 15分, 30分感作後、各液 20 $\mu$ l（約 10<sup>3</sup>CFU）を 7H10MEY 培地※に接種

※：マイコバクチン、卵黄液添加 Middlebrook7H10 寒天培地

(3) 37℃ 4か月培養後、コロニーの発育状況で判定

《牛糞混入》

滅菌乾燥糞 1 % (w/v) 含む水道水で薬剤希釈列作成

《低温感作》

薬剤希釈列を氷水中 (0.5℃ ≧) で感作

### ○温度感作試験

(1) マイクロチューブ (1.5ml) 内で滅菌生理食塩水 900 μl に菌液 (4.0 × 10<sup>5</sup>CFU/ml) 100 μl 混和

→ ヒートブロックで所定の感作

63℃ 15分、30分

70℃ 15分、30分

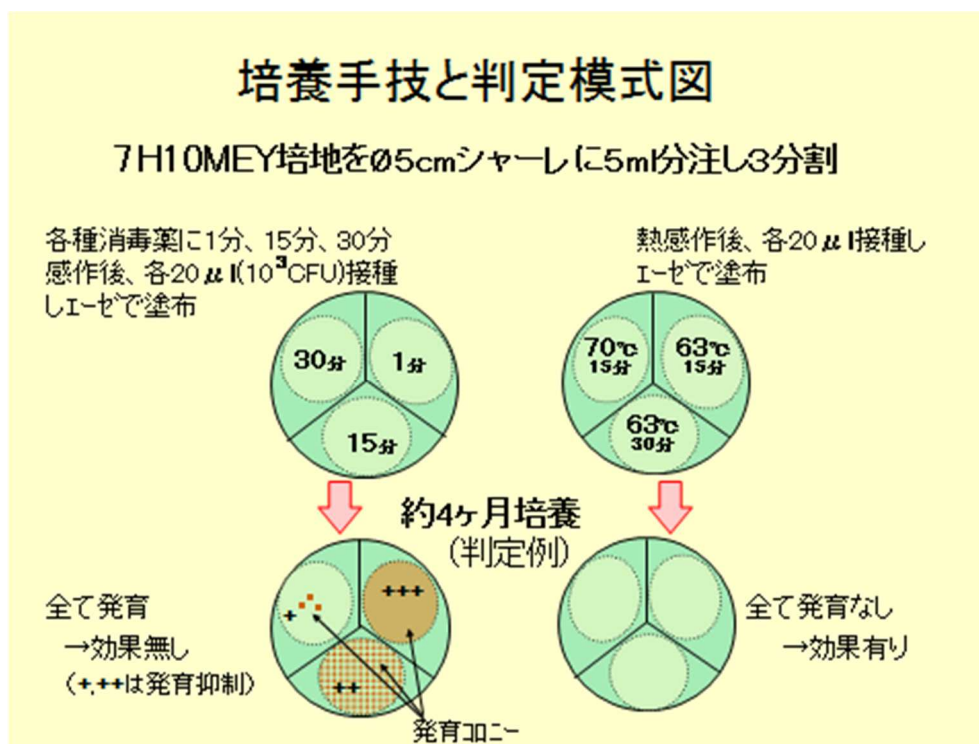
80℃ 5分、15分

85℃ 5分

90℃ 5分

→感作後各 20 μl を 7H10MEY 培地に接種

(2) 37℃ 4ヶ月培養後、コロニーの発育状況で判定



### 3 結果

① クリアキル及びビルコンは、400倍希釈で殺菌されなかった。

クリアキルはアルカリ化しても殺菌されなかった。

② 4%炭酸ソーダは30分感作で殺菌されなかった。

③ クレンテは、400倍希釈15分以上感作で殺菌されたが、低温下では殺菌されなかった。

- ④消毒用アルコールは 30 秒の感作で殺菌された。  
 ⑤消石灰は 20 倍希釈 1 分で殺菌されたが、牛糞混入及び低温下で効果が抑制された。  
 ⑥低温下では供試薬剤全てで効果が低下した。  
 ⑦温度は、63℃15 分以上の感作で殺菌された。

消毒薬殺菌効果整理表		○:殺菌 △:一部殺菌 ×:30分感作で効果無し					
既存情報		希釈倍率	定法		牛糞混入	低温	
×	クリアキル-100	400 倍	1分	×	×	×	×
			15分	△			
○	〃 0.1%NaOH添加		×	×	×		
○	〃 0.5%消石灰添加		×	×	×		
○	クレンテ	400 倍	1分	△	1分	△	30分 △
			15分	○	15分	○	
		800 倍	1分	△	判定不能 <sup>※</sup>	判定不能 <sup>※</sup>	
30分	○						
		1600 倍	判定不能 <sup>※</sup>		×	×	
○×	ビルコン	400 倍	×		×	×	
○	消石灰	10 20 倍	1分	○	30分 △	1分	×
						30分	△
○	4%炭酸ソーダ		1分	×	×	1分	×
			15分	△		15分	△
○×	消毒用エタノール		30秒	○			
△×	オルソ剤(タベゾール、トライキル)	備考 感作時間:1分、15分、30分 (アルコールのみ30秒、1分、5分)					
△×	ヨウ素剤(クリンナップ、ファインホール他)						
○×	アルデヒド系(グルタクリン)	※判定不能:培地乾燥、カビ発生等のため					

#### 温度感作判定

温度	63℃		70℃		80℃		85℃	90℃
時間(分)	15	30	15	30	5	15	5	5
判定	全てコロニー発育なし(効果有)							

#### 4 考察

- 供試消毒薬は一部を除き常用希釈範囲では十分な殺菌効果が得られなかった。より高濃度での試験が必要。相対的には、クレンテ、消石灰が優れていた。  
 ○牛糞混入では 4 %炭酸ソーダ、消石灰で、低温ではクレンテ、消石灰で効果の低下が認められた。  
 ○温度感作では、63℃15 分以上で効果が認められた。汚染糞尿については適切な堆肥化処理により対策が可能と思われた。  
 ○本試験は野外ヨーネ菌 1 株の成績のため、菌株間の差の有無については今後の課題。

## 県内で分離されたヨーネ菌の遺伝子解析及び細菌学的考察

東部家畜保健衛生所 ○牛山 市忠・松下 摩弥

### 【概要】

H27～28年度に実施した本県のヨーネ病5条検査等において、7戸20頭のヨーネ病の患畜を摘発、H27年度の摘発はH21年度以来6年ぶりの県内摘発事例であった。

今回、過去2年間のヨーネ病患畜から分離された菌株についてとりまとめるとともに、「結核菌群及び鳥結核菌の分子疫学的マニュアル」(動衛研研究報告)に従ってVNTR型別を実施し、さらに全国の状況と県内の疫学的ルーツの比較検索のための菌株の遺伝子解析を実施したのでその概要を報告する。

### 【発生概要】

#### 1. 摘発状況

本県は、4年に一度の5条検査を実施していること、平成25年度からヨーネ病のリアルタイムPCR検査による診断がなされるようになったことなどから一概に過去との比較は出来ないものの、平成27～28年度において多くのヨーネ病患畜を摘発した(図1)。

平成27年の5条検査における摘発は、平成21年の摘発以来6年ぶりの摘発であり、その後も平成27～28年度に摘発がなされたことから、7戸20頭(平成27年度に4戸6頭、平成28年度に4戸14頭)のヨーネ病患畜を摘発した(表1)。

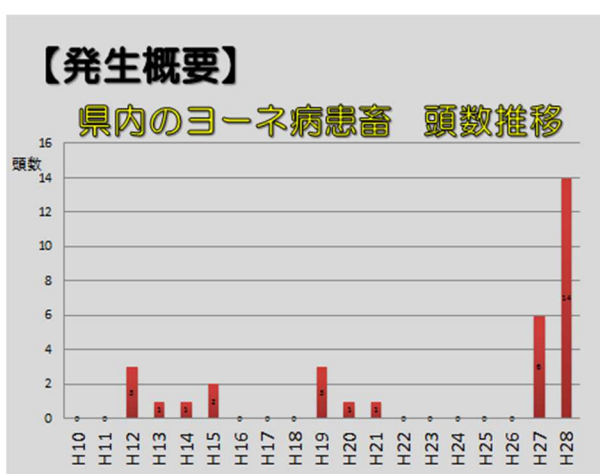


図1

#### 2. 検査成績

過去2年における、患畜摘発を検査区分毎に分類すると5条検査、患畜摘発後の同居牛検査、移出時の検査での摘発であり、臨床症状を伴う病性鑑定での摘発は無い。また、摘発牛はすべて県内産であり、患畜が摘発された農場間同士での牛の移動など疫学的な関連が無いなかでの、続発であった(表1)。

患畜の年齢分布は1歳未満が4頭(20%)、2～4歳が10頭(50%)、5歳以上が6頭(30%)であり、摘発時の排菌量(遺伝子量)は、0.001～14.05pg/wellと幅があり全体の平均は0.716pg/wellであった。3歳以上で排菌量の多い個体が散見され、遺伝子検査で陽性であったものの菌が分離されない個体も6頭(1歳未満4頭、2歳、5歳で各1頭)確認された(表2、図2)。

表1

連番	飼養者	自家	年齢	種類	検査区分
H27-1	A	自家産	6	H	5条検査
H27-2	B	自家産	6	J	5条検査
H27-3	B	自家産	2	J	5条検査
H27-4	C	自家産	5	H	5条検査
H27-5	B	自家産	0	J	同居牛検査
H27-6	D	自家産	4	B	移出時の自主検査
H28-1	E	自家産	4	H	5条検査
H28-2	B	自家産	4	J	同居牛検査
H28-3	B	自家産	0	J	移出時の自主検査
H28-4	B	自家産	0	F1	移出時の自主検査
H28-5	B	自家産	0	F1	移出時の自主検査
H28-6	B	自家産	8	J	同居牛検査
H28-7	B	自家産	4	J	同居牛検査
H28-8	F	自家産	5	H	5条検査
H28-9	F	自家産	5	H	5条検査
H28-10	G	導入(県外)	4	H	5条検査
H28-11	F	自家産	4	H	同居牛検査
H28-12	B	自家産	4	J	同居牛検査
H28-13	B	自家産	3	J	同居牛検査
H28-14	B	自家産	2	J	同居牛検査

※病性鑑定での摘発はなく、導入牛は県内産

5条検査 同居牛検査 移出時検査

表 2

患畜	飼養者	年齢	ヨーネ菌DNA cfu/well	菌分離	病変の有無 (病理)
H27-1	A	6	8.7405	++	++
H27-2	B	5	0.0053	-	-
H27-3	B	2	0.0105	-	-
H27-4	C	5	0.0084	+	+
H27-5	B	1歳未満	0.0323	-	-
H27-6	D	4	0.0717	+	+
H28-1	E	4	14.0562	++	++
H28-2	B	4	5.7720	++	++
H28-3	B	1歳未満	0.0038	-	-
H28-4	B	1歳未満	0.0017	-	-
H28-5	B	1歳未満	0.0019	-	-
H28-6	B	8	0.0087	+	+
H28-7	B	4	0.0057	+	+
H28-8	F	5	0.0125	+	+
H28-9	F	5	0.0762	+	+
H28-10	G	4	0.0010	+	+
H28-11	F	4	0.0253	+	+
H28-12	B	4	0.1361	+	+
H28-13	B	3	2.6450	++	++
H28-14	B	2	0.0424	+	+

菌量多い個体      菌分離なし

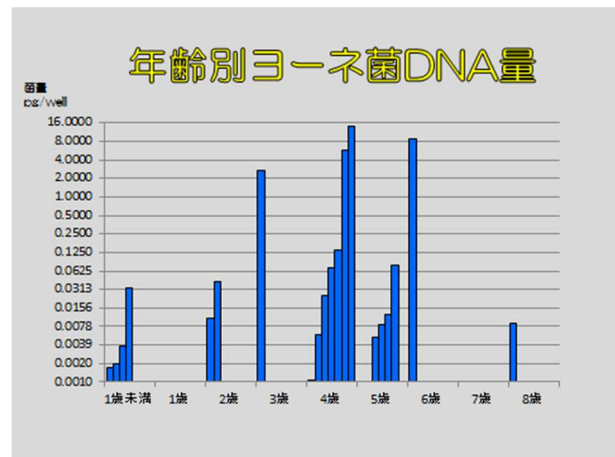


図 2

3. まとめおよび考察①

平成 27～28 年度の検査において、7 戸 20 頭のヨーネ病患者を摘発し、排菌量について年齢毎に比較したところ、主に 3 歳以上で排菌量が多い傾向があった。すべて県内産の個体であり臨床症状は認められなかった。

これらのことから、患畜は感受性の高い時期（主にヨーネ病では 6 ヶ月齢未満）に各農場内でヨーネ菌に暴露、感染し、抗体の上がる時期（2～3 歳）であった H27～28 の検査で摘発することが出来たものと考えられた。また、主に 1 歳未満の患畜で菌分離がない個体については、病理学的検査でも病変が認められないことから通過菌の可能性が考えられた。このような通過菌の個体が認められる農場では、環境中に菌を排菌している個体がいる可能性が考えられ、農場内にいる排菌牛を早期に摘発することが対策として重要である。

【遺伝子解析】

1. 遺伝子分布状況

国内外のヨーネ菌遺伝子型については、西森ら[1]は国内 204 農場由来の分離菌株の VNTR 型により、それらは 12 型に分類され、そのうち Map-1 および 2 が主要な型であり、それぞれが 32.7% および 52.2% を占めたと報告している。また、1997 年から 2004 年に輸入検疫で摘発された北米産輸入牛由来株の 72.7% が Map-1 型であり、Map-2 型は 6.1% であったとされている[2]。一方、近年輸入が増加している豪州産牛について 2005 年から 2011 年に分離された株を検査したところ、Map-11 と Map-13 で約 67% を占めていたとの報告もある[3]（図 3）。



図 3



以上のような状況のなか、平成 27～28 年度の検査で 7 戸 20 頭の患畜が摘発され、ヨーネ菌株が収集されたこと、近年の繁殖素牛の不足により海外から輸入牛が増加していることから本県で検出されたヨーネ菌の遺伝学的ルーツ検索のための遺伝子解析を実施することとした。

## 2. 材料および方法

7 戸 11 株 (H27～28 年度分離した県内ヨーネ菌株) (表 3) について、ヨーネ菌用培地 (共立製薬) 上で 37℃、3 ヶ月継代後、Insta Gene Purification Matrix (Bio-Rad) にて DNA を抽出しテンプレート DNA とした。縦列反復多型 (VNTR) 型別については、西森ら [4] の方法により実施し、短鎖反復多型 (MLSSR) 型別および 1 塩基多型 (SNP) 型別については、Amonson ら [5] の方法により実施した。シーケンスについては、北海道システム・サイエンスにて実施し、得られた Raw データについて FinchTV にて解析を実施した (図 4, 5)。

表 3

### 遺伝子解析：材料及び方法

材料：7戸11株 (H27～28 年度分離したヨーネ菌株)

菌株 No	産地	発生日 月日	飼養者	生年月日	自家産	ヨーネ菌濃度 cfu/ml	月齢	性別	産種	用途
1	H27-1	H27.7.1	A	H21.12.18	自家産	8.74	67	雄	H	乳用牛
2	H27-4	H27.8.6	C	H22.5.30	自家産	0.008	63	雄	H	乳用牛
3	H27-6	H28.3.9	D	H24.8.30	自家産	0.072	43	雄	B	肉用
4	H28-1	H28.6.17	E	H24.7.7	自家産	14.056	48	雄	H	乳用牛
5	H28-2	H28.6.29	B	H24.6.27	自家産	5.772	49	雄	J	乳用牛
6	H28-6	H28.7.27	B	H20.5.5	自家産	0.0087	100	雄	J	乳用牛
7	H28-7	H28.7.27	B	H24.12.26	自家産	0.0057	44	雄	J	乳用牛
8	H28-8	H28.8.31	F	H23.6.19	自家産	0.0125	63	雄	H	乳用牛
9	H28-9	H28.8.31	F	H24.3.21	自家産	0.0762	54	雄	H	乳用牛
10	H28-10	H28.8.31	G	H24.5.30	導入	0.0010	52	雄	H	乳用牛
11	H28-11	H28.9.12	F	H24.8.28	自家産	0.0233	49	雄	H	乳用牛

※導入牛は県内産

方法：縦列反復多型 (VNTR) 型別  
短鎖反復多型 (MLSSR) 型別、1 塩基多型 (SNP) 型別

#### <縦列反復多型 (VNTR型別) 検査法>



図 4

#### <短鎖反復多型 (MLSSR) 型別 ・1 塩基多型 (SNP) 型別検査法>



図 5

## 3. 結果

Map (VNTR 型別) 決定では菌株 No. 4 のみ Map-1 で、それ以外は Map-2 という結果となった (表 4)。また、さらに VNTR 型別を細分化するために、MLSSR 型別および SNP 型別を実施したところ Map-2b4、Map-1a5 と分類された (表 5)。なお SNP 型別では、locus1 配列において TAC に続く部分が、GC が a 型、GG が b 型と分類し、locus7 の部分は 4 と 5 と 2 種類に分けることが出来た。

表 4

**結果① Map (VNTR型) の決定**

菌株 No	購入		畜種	VNTR 型	MATR																					
	年月日	飼養者			0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16					
1	H27.7.3	A	67	H21.12.16	白変産	H	汎用牛	Mac-2	1	1	3	2	0	2	2	2	2	1	1	2	1	0	2	1	3	
2	H27.8.7	C	63	H22.6.30	白変産	H	汎用牛	Mac-2	1	1	3	2	0	2	2	2	2	1	1	2	1	0	2	1	3	
3	H28.3.16	D	43	H24.8.30	白変産	E	汎用牛	Mac-2	1	1	3	2	0	2	2	2	2	1	1	2	1	0	2	1	3	
4	H28.6.20	E	48	H24.7.7	白変産	H	汎用牛	Mac-1	1	1	3	2	0	2	2	2	2	2	1	1	2	1	0	2	1	3
5	H28.6.30	B	49	H24.6.27	白変産	J	汎用牛	Mac-2	1	1	3	2	0	2	2	2	2	1	1	2	1	0	2	1	3	
6	H28.7.29	B	100	H20.8.5	白変産	J	汎用牛	Mac-2	1	1	3	2	0	2	2	2	2	1	1	2	1	0	2	1	3	
7	H28.7.29	B	44	H24.12.26	白変産	J	汎用牛	Mac-2	1	1	3	2	0	2	2	2	2	1	1	2	1	0	2	1	3	
8	H28.8.1	F	63	H23.8.19	白変産	H	汎用牛	Mac-2	1	1	3	2	0	2	2	2	2	1	1	2	1	0	2	1	3	
9	H28.8.1	F	54	H24.3.20	白変産	H	汎用牛	Mac-2	1	1	3	2	0	2	2	2	2	1	1	2	1	0	2	1	3	
10	H28.9.2	G	52	H24.9.30	導入	H	汎用牛	Mac-2	1	1	3	2	0	2	2	2	2	1	1	2	1	0	2	1	3	
11	H28.9.13	F	49	H24.9.26	白変産	H	汎用牛	Mac-2	1	1	3	2	0	2	2	2	2	1	1	2	1	0	2	1	3	

表 5

**結果② 遺伝子型の決定と多様性の確認**

菌株 No	飼養者	月齢	生年月日	畜種	遺伝子型	S N P	MLSSR シークエンス解析 (locus)						VNTR 型	
							1	2	7	8	9	11		
1	A	67	H21.12.16	H	汎用牛	Mac-2b4	b	16	13	4	5	5	5	Mac-2
2	C	62	H22.6.30	H	汎用牛	Mac-2b4	b	>=17	15	4	5	5	5	Mac-2
3	D	43	H24.8.30	E	汎用牛	Mac-2b4	b	15	12	4	5	5	5	Mac-2
4	E	47	H24.7.7	H	汎用牛	Mac-1a5	a	9	10	5	5	5	5	Mac-1
5	B	48	H24.6.27	J	汎用牛	Mac-2b4	b	20	13	4	5	5	5	Mac-2
6	B	99	H20.8.5	J	汎用牛	Mac-2b	b	17	14					Mac-2
7	B	43	H24.12.26	J	汎用牛	Mac-2b	b	18	13					Mac-2
8	F	62	H23.8.19	H	汎用牛	Mac-2b4	b	>=19	14	4	5	5	5	Mac-2
9	F	53	H24.3.21	H	汎用牛	Mac-2b	b	17	14					Mac-2
10	G	51	H24.9.30	H	汎用牛	Mac-2b4	b	15	13	4	5	5	5	Mac-2
11	F	49	H24.9.26	H	汎用牛	Mac-2b	b	16	13					Mac-2

斜線部分は、検査未実施

Locus1, 2 部分の塩基数については、多様な値となったことから Locus1 を横軸に Locus2 を縦軸に農家毎に色を変え分布図を作成した(図 6)。Map-1 は完全に独立しているが、Map-2 については個々の農家でまとまりそうなどころがあるものの様々な分布となった。VNTR に比べて 1 塩基繰り返しの変異頻度は高いと考えられており、今回同一の農場でも違った分布となっていることは、同一牛群内での感染履歴が長かったことをあらわしているものと考えられた。

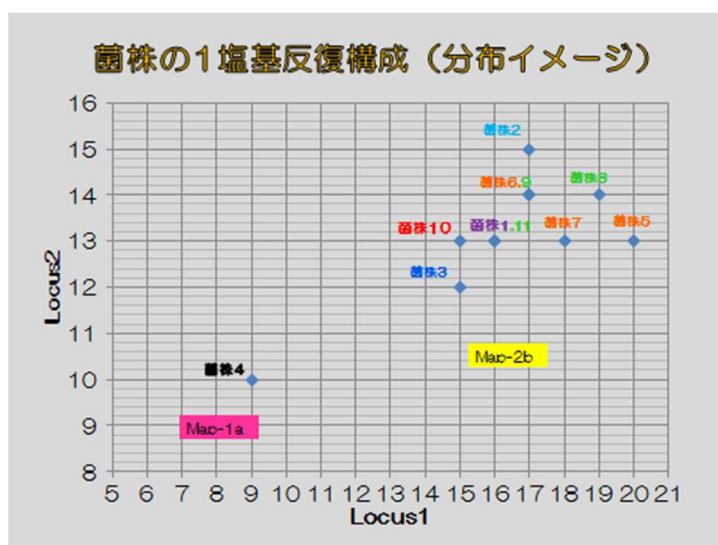


図 6

4. まとめ及び考察②

遺伝子解析の結果、遺伝子型で国内主流の Map-1a5、Map-2b4 を県内でも確認した。内訳としては、Map-2b4(6 戸, 86%)Map-1a5(1 戸, 14%)であり、また、MLSSR の解析では Locus1, 2 の分布で複数の遺伝子型の存在を確認することができた。患者はすべて県内産であったこと、遺伝子型は多様性のある Map-1、Map-2 であったことから、過去に複数の要因により県内に侵入、農場内に潜伏していた可能性が考えられた。農場内における日頃からの衛生管理徹底、導入牛検査、感染牛の早期摘発等を実施し、今後も防疫対策の強化を図っていく必要がある。



表 6

ヨーネ菌遺伝子型別の主な報告事例

報告年	県・国	内容
H17	動物検疫所	北米産輸入牛由来菌：Map-1 (72.7%) Map-2 (6.1%) (第4回全国家畜保健衛生業績発表会)
H17	北海道 (根室)	Map-1：45.7%、Map-2：12.6%、Map-3：23.4% Map-4：7.4%、Map-6：2.3%、Map-14：8.0% Map-15：0.6% (北海道畜産保健衛生業績発表会)
H18	京都府	Map-2：9株 (カナダ輸入牛3頭含む) (京都府畜産保健衛生業績発表会)
H19	岩手県	Map-1：2農場、Map-2：10農場 Map-8：2農場 MLSSP併用 (岩手県畜産衛生年報)
H21	北海道 (宗谷)	Map-2、Map-8の分離報告 (北海道畜産保健衛生業績発表会)
H24	動物検疫所	臺灣産牛由来株：Map11.13 ニュージーランド産アルパカ：Map-8 (第53回全国家畜保健衛生業績発表会)
H27	兵庫県	Map-1a分離報告 (兵庫県畜産保健衛生業績発表会)
H29	山梨県	Map-2b (6戸)、Map-1a(1戸) MLSSP、SNP検定遺伝子 (山梨県畜産保健衛生業績発表会)

今回の成果は、ヨーネ菌遺伝子解析を初めて県内で実施したことにより、国内におけるデータベース蓄積に寄与することが出来た(表6)、今後もデータの蓄積を実施していき効率的な防疫対策の推進に貢献していく。

最後に、遺伝子解析についてご助言等いただいた農研機構動物衛生研究部門の西森敬先生に深謝いたします。

- [1]Nishimori k et al:Proceeding of the 9<sup>th</sup> international Colloquium on Paratuberculosis, 276(2007)
- [2]衛藤真理子：第46回全国家畜保健衛生業績発表会・動物検疫所(2005)
- [3]水城恵美：第53回全国家畜保健衛生業績発表会・動物検疫所(2012)
- [4]西森敬ら：VNTR型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル
- [5]Alongkorn et al:Multilocus Short Sequence Repeat Sequencing Approach for Differentiating among *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Strains

## 骨髓低形成を伴う子牛の死亡事例

東部家畜保健衛生所

○高橋優花・松下摩弥

### 【はじめに】

骨髓低形成は、骨髓における赤血球系、白血球系及び血小板系の造血細胞の新生が低下した状態であり、脂肪細胞による造血領域の置換と3系統の造血細胞の減数が特徴である。平成29年7月、急死した9日齢の子牛1頭において骨髓低形成が認められたため、その概要を報告する。

### 【症例概要】(図1)

搾乳牛約180頭を飼養する農場において、カウハッチで飼養される平成29年6月26日生まれのホルスタイン子牛1頭が、7月5日午前より衰弱し、同日16時頃死亡したため、病性鑑定を実施した。当該牛は同日に発熱、呼吸速拍、肺音粗励、末端皮温冷感、粘膜蒼白、黄色水様下痢を呈していた。当該牛は以前に治療歴はなかった。



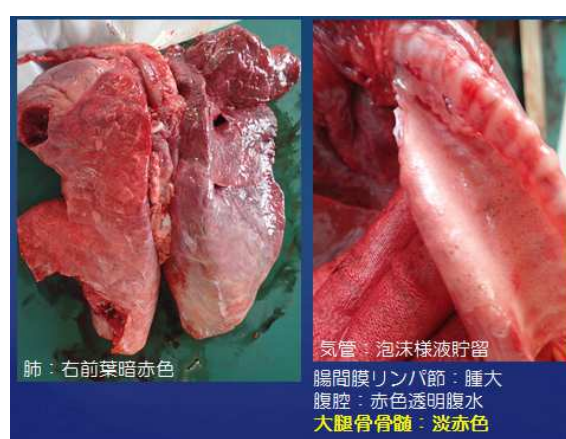
【図1 当該牛飼養カウハッチ】

### 【剖検所見】

諸臓器および粘膜が褪色し、全体的に白味を帯びていた(図2)。気管内腔には泡沫様液が貯留し、肺は一部暗赤色を呈していた(図3)。腹腔には赤色透明腹水が少量貯留していた第一胃には乾草が充満し、第四胃粘膜はやや赤色を呈し、腸間膜リンパ節は腫大していた。大腿骨骨髓は赤色であった。



【図2 剖検所見①】



【図3 剖検所見②】

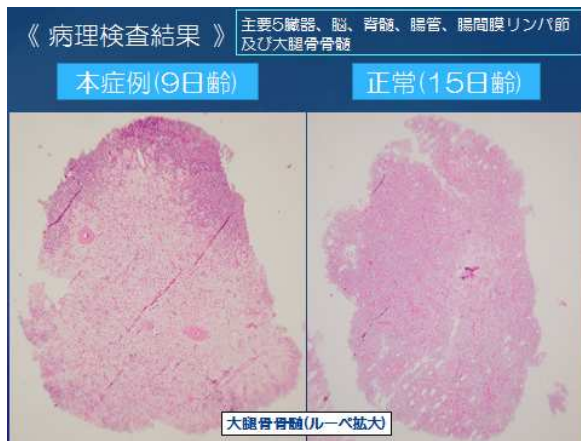
### 【病原検索結果】

主要5臓器、脳、消化管・第四胃内容物、腹水及び腸間膜リンパ節を用いて常法に従い細菌分離

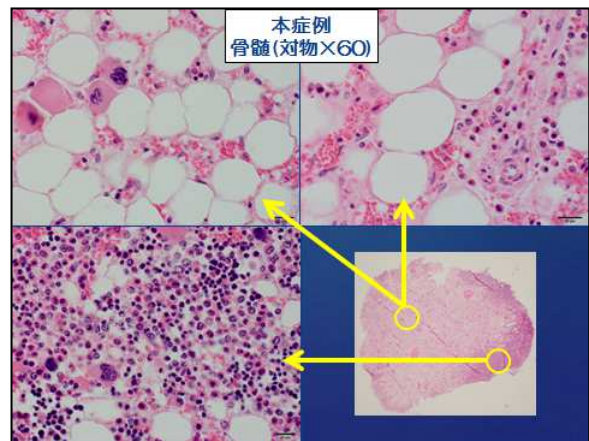
検査を実施した。第四胃・十二指腸・空腸内容物及び腸間膜リンパ節を用いて大腸菌毒素及び定着因子特異遺伝子検査を、10%肺乳剤を用いて *Mycoplasma bovis* 特異遺伝子検査を実施した。ウイルス検査として、呼吸器疾患や下痢を誘発するウイルスについて遺伝子検査を実施した。全ての検査において、有意な病原体は検出されなかった。

【病理学的検査】

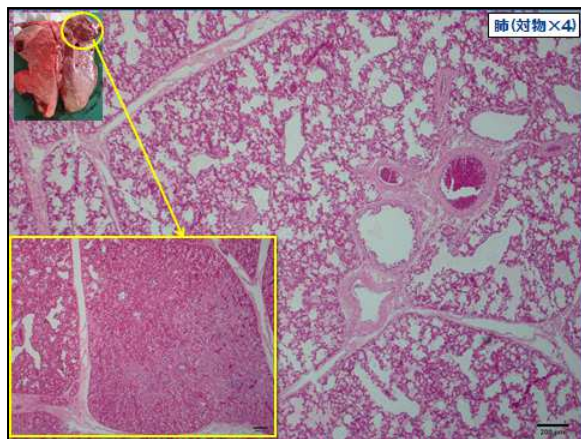
大腿骨骨髓では3系統の造血細胞が重度に減少し、大部分は脂肪細胞により置換されていた（図4、5）。肺では一部の肺胞腔において炎症細胞、線維素、漿液が軽度～中程度に認められた（図6）。気管支腔にも炎症細胞が浸潤していた。



【図4 正常骨髓（右側）との比較】



【図5 骨髓（強拡大）】



【図6 肺】

【まとめ】

骨髓低形成の原因は感染症、中毒、放射線及び薬物等とされているが、当該牛はカウハッチで飼養されていたこと、単独発生であること、急変前に投薬歴がないこと等から、本症例の骨髓低形成についてそれらの関与は考えにくい。死亡原因については、各種検査結果より感染症は否定された。病理学的検査において肺の一部に炎症が認められたものの、大部分は正常に機能していたと考えられたため、死亡の主原因ではないと考えられた。

若齢の子牛が全系統の血球減少を示す汎血球減少症を伴い発熱と出血傾向等を呈して死亡する症例は、Bleeding Calf Syndrome 等と呼ばれ、原因不明の疾病として 2007 年頃から国内外で報告

されている。本症例の骨髄の一部には造血領域が残存しており、血小板がわずかに産生されていたため出血傾向が認められなかったと考えられるが、その他の臨床症状、発生状況、剖検所見及び病理所見においては報告症例に類似していた。当該牛は急死したため血液検査未実施で確定診断には至らなかったが、以上のことから骨髄低形成により汎血球減少症を呈したことで Bleeding Calf Syndrome 様症状を呈し、急死したと推察された。



## 鵜飼いで用ウミウに発生した鳥ポックスウイルス感染症

東部家畜保健衛生所

○小林 洋平・松下 摩弥 他

### 【概要】

F市では夏の伝統行事である「鵜飼い」に用いるウミウを飼育している。ウミウは自然界に生息する野鳥であり、ウミウの捕獲は現在では国内1箇所のみで許可されており、F市のウミウもその捕獲地から導入している。本年7月10日、全国の鵜飼い団体等からなるウミウ捕獲技術保存協議会からF市に、全国各地に今年導入されたウミウの一部において発痘等が認められているとの情報が入り、同日F市職員が確認したところ、飼養全6羽中5羽（今年導入5羽中4羽、昨年から継続飼養1羽）において嘴・眼瞼周囲の発痘及び元気消失等の症状が認められた。13日にF市からの依頼で病性鑑定を実施したところ、鳥ポックスウイルス（Avian poxvirus、以下 APV）感染によるものと診断したので、その概要を報告する。

### 【材料と方法】

立ち入り時、症状を呈していた個体はその症状の程度から重度が1羽（No.1）、中軽度が4羽（No.2～5）であった（図1）。

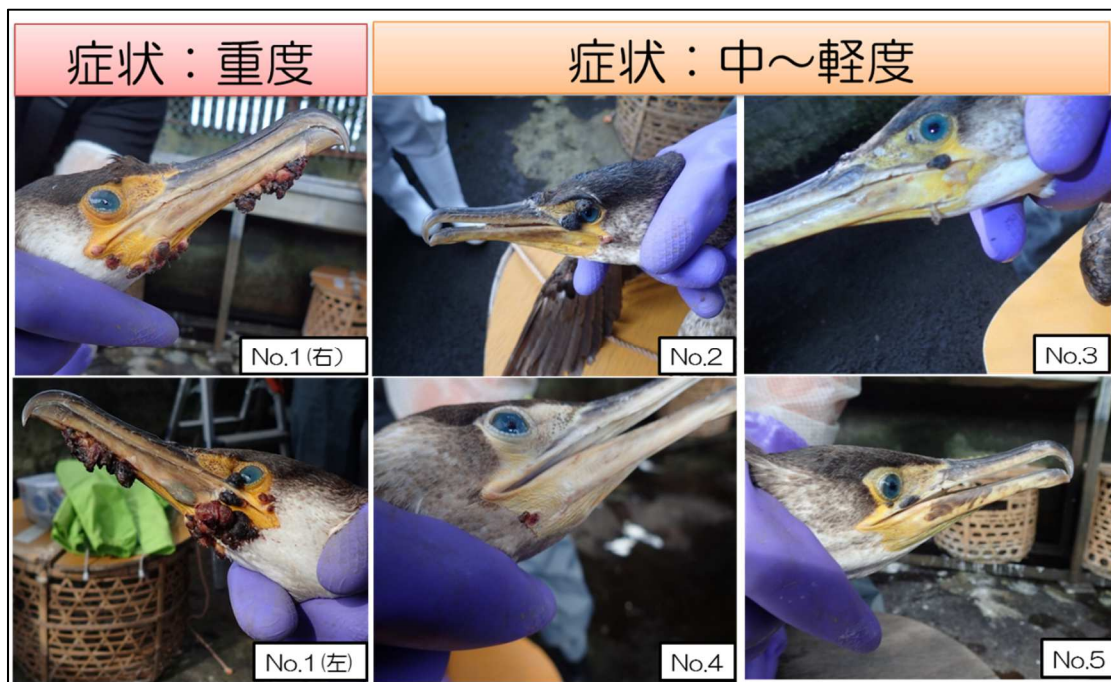


図1

症状を呈した5羽中3羽（No.1～3）の発痘部を採材し、以下のとおり病性鑑定を実施した。

#### 1. 遺伝子検査

No.1～3の各検体10%乳剤を作成し、市販キットにより核酸抽出後、APVの核蛋白遺伝子（4b領域）を対象としたPCRを実施。また、得られたPCR産物はシーケンスにより塩基配



列を決定し、同時期に捕獲地のウミウから検出された株との比較を行うとともに系統樹解析を実施した。

## 2. ウイルス分離検査

上記乳剤を 10 日齢発育鶏卵を用いて漿尿膜上に 0.1ml 接種、5 日間培養した。培養後割卵し、肥厚・ポックが認められた漿尿膜については 1. の方法と同様に遺伝子検査を実施した。

## 3. 病理学的検査

No.1 及び 2 の発痘部と、ウイルス分離検査において肥厚・ポックが確認された漿尿膜について、10%中性緩衝ホルマリンにて固定、HE 染色後鏡検した。

### 【結果】

#### 1. 遺伝子検査

全検体から目的サイズの PCR 産物 (578bp) を検出。遺伝子解析の結果、捕獲地検出株と 100%一致し、系統樹解析の結果からアラスカの Pelagic cormorant (ヒメウ) や韓国の Eurasian eagle owl (ワシミミズク) 等から検出された野鳥由来株と近縁な APV と判定。また、今回の No. 1~3 から検出された株及び捕獲地で検出された株についてはいずれも 100%一致していた。(図 2)

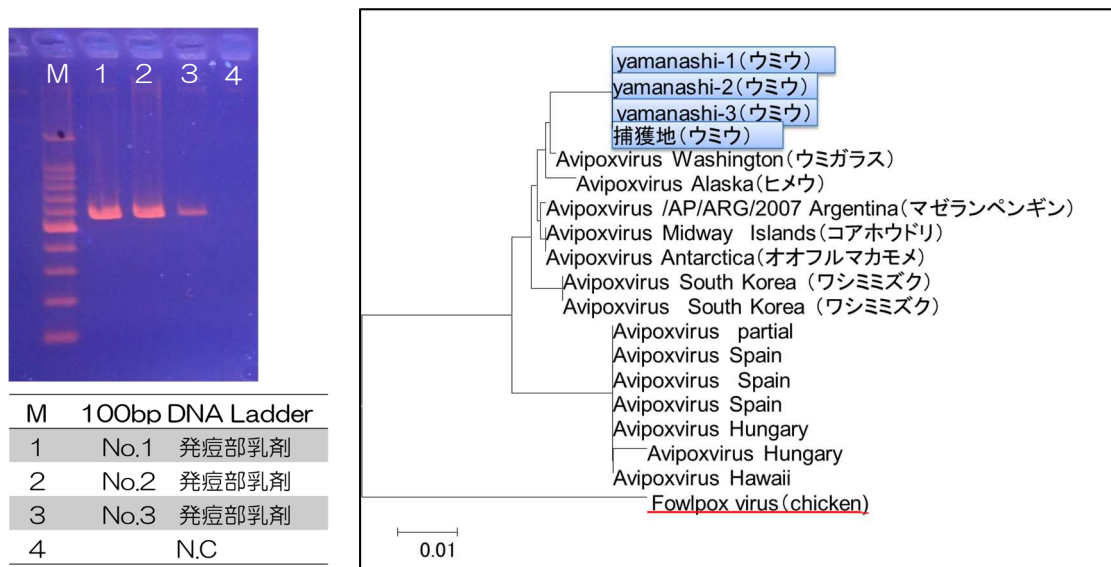


図 2

## 2. ウイルス分離検査

No.1 及び No.2 では漿尿膜の肥厚、No.3 ではポックの形成及び若干の肥厚が確認された (図 3)。また、いずれの漿尿膜においても PCR 検査で目的サイズの PCR 産物が確認された。

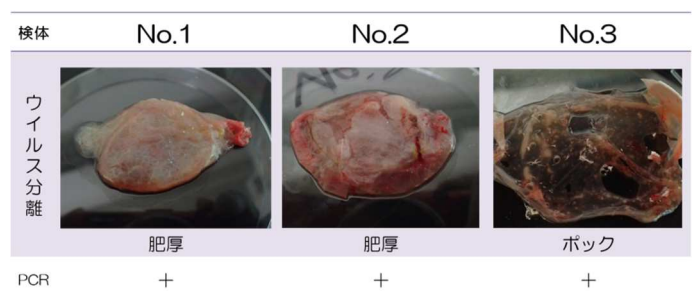


図 3

### 3. 病理学的検査

No.1 及び 2 の発痘部では有棘細胞層の上皮細胞が風船様に膨化、細胞質内には好酸性封入体(矢印：ボリンゲル小体)が認められた。また、ウイルス分離検査において得られた漿尿膜についても同様の封入体が認められた。

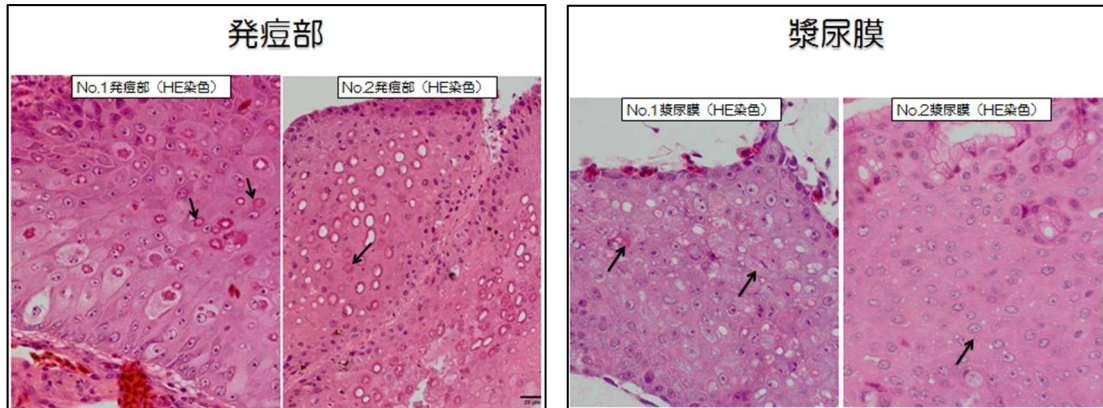


図 4

#### 【対 策】

鶏の届出伝染病である鶏痘に準じた対策、すなわち蚊やハジラミ等の吸血昆虫の駆除、ホコリや糞の飛散防止、消毒の励行等の衛生対策について指導した。鶏痘の場合、通常 3～4 週間の経過で回復するとされており、今回の APV 感染症についても 1 ヶ月後に再度確認したところ全羽症状は治まり回復した。

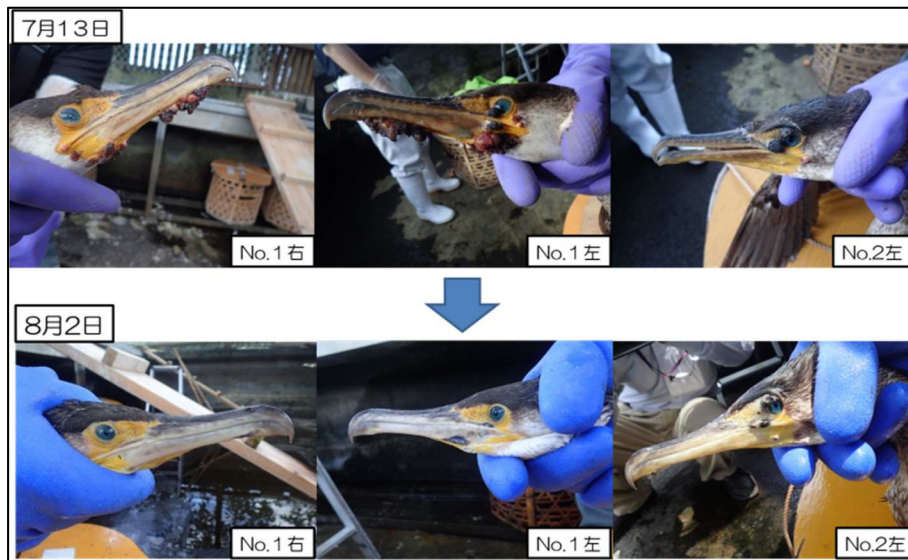


図 5

#### 【考 察】

病性鑑定結果から今回発生した鶉飼用ウミウの発痘は APV 感染によるものと診断した。発症した 5 羽の病変の程度が異なっていたものの、各個体 (No. 1～3) から検出されたウイルス遺伝子は 100%一致し、個体・感染時期・年齢等による差と推察された。

また、遺伝子解析の結果からアラスカ、アメリカや韓国等の野鳥から検出されたウイルスと近縁であり、自然界に生息する野鳥由来のウイルスと考えられた。ウミウはもともと自然界に生息している個体を捕獲していること、本県以外にも同時期に発生報告があること、捕獲地での検出株と遺伝子解析の結果 100%一致したこと等から、本病については導入前に捕獲地で APV に感染したウミウが本県を始め全国各地へ供給されたと推察された。なお、症状が確認されるまで導入から約 1 ヶ月が経過していたことから、鶏痘と比較すると潜伏期間が異なる可能性も示唆された。

今回の事例は自然界では様々な病原体が流行し、野鳥（野生動物）はそれらを保有している可能性が充分あることを示唆している。家畜保健衛生所としてそれらの病原体が家きん（家畜）に蔓延しないよう野生動物の侵入防止を始め飼養衛生管理を徹底していくことが重要であると改めて考えられた。