

Mannheimia 属菌による牛の化膿性脳脊髄炎

東部家畜保健衛生所 森西恵子 矢野敦史 山本英次 宮本純子

発生概要

管内の 200 頭規模の肉用牛肥育農家で、5 ヶ月齢の肥育用子牛 1 頭が、2008 年 8 月、発熱、元気・食欲不振、右顔面下垂（視力有り）、流涎の症状を示した。肺音軽度粗雑。共済獣医師が 1 週間治療を行うが反応せず、病性鑑定を行った。

検査方法

病理組織学的検査：定法により主要臓器の HE 染色を実施した。

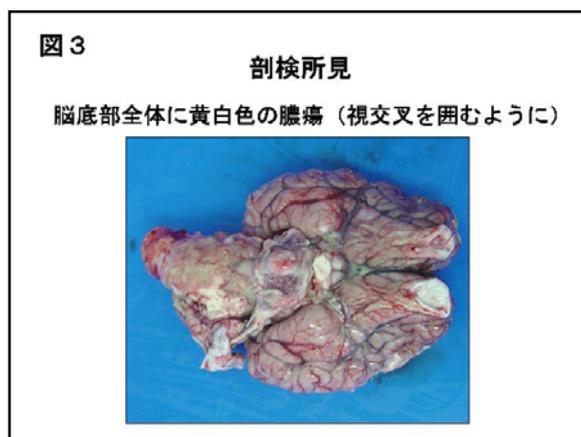
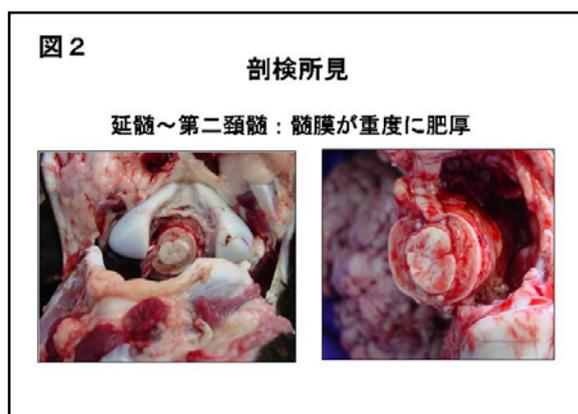
細菌学的検査：主要臓器および膿瘍について、5%羊血液寒天培地および DHL 培地で好気培養および CO₂ 培養を行った。

ウイルス学的検査：主要臓器についてウイルス分離を実施した。また IBR と BVD の PCR 検査を実施した。

検査結果

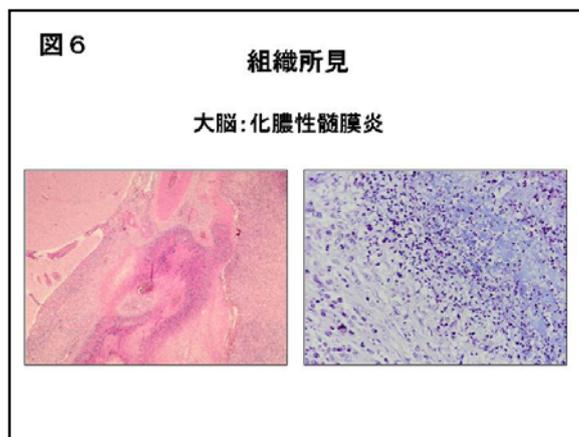
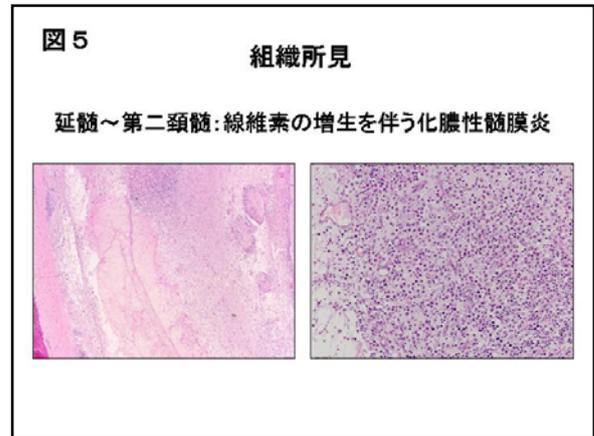
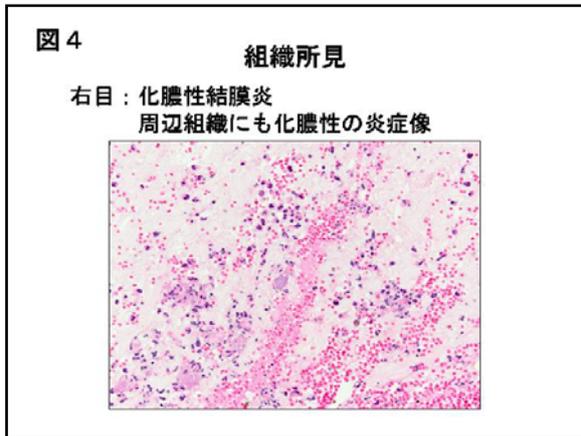
[剖検所見]

右眼球は白濁し、眼球結膜は肥厚し、周囲組織全体に出血痕がみられた（図 1）。また、延髄から第二頸髄にかけて髄膜が重度に肥厚していた（図 2）。黄白色の膿瘍が視交叉を囲むように脳底部全体にみられた（図 3）。



[組織所見]

右目に化膿性結膜炎がみられ、周囲組織にも化膿性の炎症像がみられた（図4）。延髄から第二頸髄に繊維素の増生を伴う化膿性髄膜炎がみられた（図5）。大脳は脳底部に化膿性髄膜炎がみられた（図6）。



[細菌検査]

大脳からはほぼ純粋にグラム染色陰性の小型球桿菌を分離した。

この菌は、簡易同定キット（Api20NE、シスメックス・ビオメリュー）を用いた生化学的性状検査で、*Mannheimia haemolytica*（プロファイル：1020004、ID92.9%）と同定された。

右目と脳底部からは、レンサ球菌が分離され、簡易同定キット（ApiStrep20、シスメックス・ビオメリュー）で *Streptococcus suis*（プロファイル：4740473、ID99.2%）と同定された。

他主要臓器からは有意菌の分離はなかった。

検査手技および培地での分離状況から、大脳から分離された *Mannheimia haemolytica* が今回の症例では重要と考えた。

*Mannheimia haemolytica*は、複数の生物型が存在し、*Mannheimia haemolytica* complexとも呼ばれていた。現在、*M. haemolytica* complexには、少なくとも*M. glucosida*、*M. granulomatis*、*M. haemolytica*、*M. ruminalis*、*M. varigena*の5菌種が含まれているとされているが、一般に用いられている生化学性状検査キットでは、*M. haemolytica*以外の菌種に対応していない¹⁾。

そこで、16S rRNA 遺伝子シーケンスによる菌種同定を試みた。

分離菌（簡易同定キットで *Mannheimia haemolytica* と同定）について、16S rRNA 遺伝子の一部をPCR法で増幅し、ダイレクトシーケンス法で塩基配列の決定を試みたところ、約1500bpの配列のうち上流より1000~1200塩基付近の一部配列が、波形の混在のため決定できなかった。

そこで、分離菌よりPCR法で増幅した遺伝子断片をプラスミドベクターにクローニングし、各クローンより抽出したプラスミドのうち7クローン分についてそれぞれシーケンスを行い、インサートの塩基配列を決定した。その結果、検査材料菌株の16S rRNA 遺伝子には、少なくとも4種類の塩基配列パターンが存在しており、最初のシーケンス時に見られた波形混在箇所にあたる部分に多様性が認められることが確認された。

この決定した4種の塩基配列（1533または1534bp）それぞれについてblast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)による相同性検索を行ったところ、いずれも *Mannheimia granulomatis* の type strain ATCC49244 の16S rRNA 遺伝子（アクセッション番号NR024899またはAY362913）との相同性が最も高かった（97.29~96.44%）。また、他の *Mannheimia* 属菌（*M. ruminalis*、*M. glucosida*）の type strain の16S rRNA 遺伝子との相同性は97.09~95.99%であった（表1）。しかしながら、16S rRNA 遺伝子の相同性97%前後という結果はデータベースとの比較による菌種の同定には不十分なものであり、菌種の同定には至らなかった。

よって、以上の結果をふまえ、分離菌は *Mannheimia* 属菌と診断した。

【表1】分離菌の16S リボゾーム RNA 遺伝子領域の塩基配列のblastによる相同性検索結果
配列 A(1533bp)

<i>M. granulomatis</i>	ATCC49244 ^T	identities 1469/1515 (96.96%) gaps 22/1515
<i>M. glucosida</i>	strain P925 ^T	identities 1459/1517 (96.18%) gaps 26/1515

配列 B(1533bp)

<i>M. granulomatis</i>	ATCC49244 ^T	identities 1470/1511 (97.29%) gaps 14/1515
<i>M. ruminalis</i>	strain HPA92 ^T	identities 1467/1511 (97.09%) gaps 14/1515
<i>M. glucosida</i>	strain P925 ^T	identities 1466/1514 (96.83%) gaps 20/1515

配列 C(1533bp)

<i>M. granulomatis</i>	ATCC49244 ^T	identities 1467/1515 (96.83%) gaps 22/1515
<i>M. ruminalis</i>	strain HPA92 ^T	identities 1460/1516 (96.31%) gaps 24/1516

配列 D(1534bp)

<i>M. granulomatis</i>	ATCC49244 ^T	identities 1464/1518 (96.44%) gaps 27/1518
<i>M. ruminalis</i>	strain HPA92 ^T	identities 1459/1520 (95.99%) gaps 31/1515

[ウイルス検査]

ウイルス分離は陰性、IBRとBVDのPCR検査は陰性であった。

まとめ

今回の症例では、延髄から第二頸髄にかけて髄膜が重度に肥厚した化膿性脳脊髄炎がみられた。

細菌学的検査により、大脳からグラム染色陰性小型球桿菌が分離され、簡易同定キットでは *Mannheimia haemolytica* と同定されたが、16S rRNA の塩基配列解析より *Mannheimia* 属菌と診断した。

そして、病理学的検査およびウイルス学的検査の結果から、今回の症例は *Mannheimia* 属菌による牛の化膿性脳脊髄炎と診断した。

なお、発生農家ではその後同様の発生はなく、単発のものであると考えられる。

謝辞

分離菌の16S rRNA 遺伝子シーケンスによる菌種同定を実施していただきました（独）農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫病研究チーム 星野尾香織研究員に深謝します。

参考文献

- 1) 勝田賢, 河本麻里子, 川蔦健司, 三上修, 小野寺利幸, 庄司智太郎, 坪井孝益; *Mannheimia* 属菌の野外実態と同定法の確立; 動物衛生研究所 研究報告 第115号 p.15-18 (2008)