

令和3年度

業務年報



Gunma Livestock Health Laboratory

群馬県家畜衛生研究所

(〒371-0103 群馬県前橋市富士見町小暮 2425-3)

目 次

1	沿 革 -----	3
2	所在地及び交通 -----	3
3	用地及び建物等 -----	4
4	機構及び人員 -----	6
5	業 務 -----	6
6	令和3年度病性鑑定実績 -----	7
	（1）依頼者・畜種別病性鑑定 -----	7
	（2）項目・畜種別病性鑑定 -----	8
	（3）家畜伝染病・届出伝染病等診断状況-----	9
7	令和3年度牛海綿状脳症検査実績 -----	10
8	職員研修 -----	11
9	付帯業務 -----	13
10	令和3年度群馬県家畜保健衛生業績発表	
	（1）豚熱抗体検査における ELISA S/P 値と中和抗体価の関係-----	16
	（2）牛の肺炎病巣から分離された <i>Mannheimia</i> 属菌の性状解析-----	23
	（3）神経指向性アストロウイルスが検出された牛の非化膿性脳炎-----	32
11	令和3年度学会・研究会（研修会）発表 -----	15
12	令和3年度誌上発表 -----	15
13	令和3年度家畜衛生研修会発表症例 -----	15

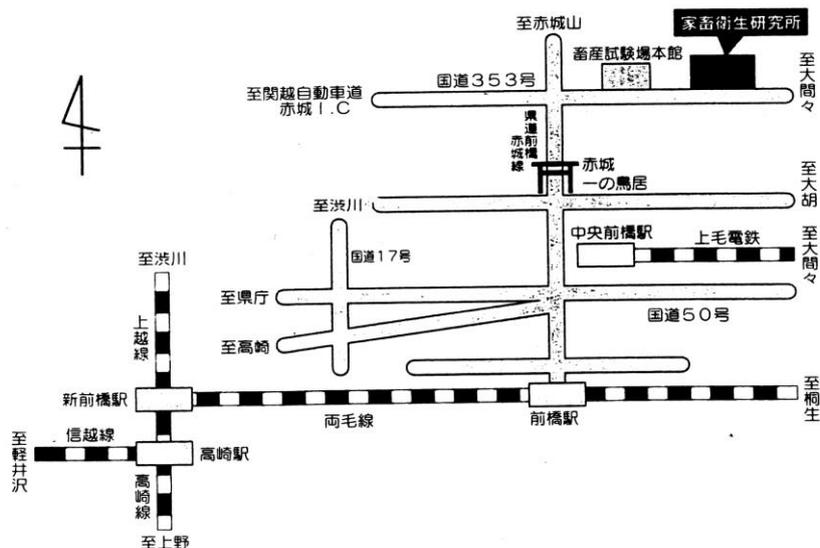
1 沿革

- 昭和 38 年 (1963) 高崎家畜保健衛生所内に病性鑑定室を併設。
昭和 44 年 (1969) 群馬県勢多郡富士見村小暮 2,416 (畜産試験場牧草地の一角) に施設を新築し、名称を群馬県中央家畜病性鑑定所に改め、病理、細菌及び一般臨床診断部門を備えた組織に整備 (畜産試験場衛生課が同居)。
昭和 45 年 (1970) 鶏病病性鑑定強化事業の助成を受け、ウイルス部門を整備。
昭和 47 年 (1972) 生化学病性鑑定強化施設整備事業および家畜衛生技術研修施設設置事業の助成を受け、生化学部門を拡充し総合的家畜疾病診断施設に整備。
昭和 57 年 (1982) 中央家畜病性鑑定所と畜産試験場衛生課を統合し、群馬県家畜衛生研究所と改称。
平成 7 年 (1995) 現在地に新庁舎を建設し全面移転。
平成 15 年 (2003) BSE 対策特別措置法による 24 か月齢以上の死亡牛 BSE 検査施設を整備。組織改正により、微生物グループ、病理生化学グループ、BSE グループの 3 グループに改編。
平成 20 年 (2008) 組織改正により、微生物係、病理生化学係、BSE 係の 3 係に改編。
平成 21 年 (2009) 市町村合併により、住所表記が前橋市富士見町小暮に変更。
平成 30 年 (2018) 組織改正により、微生物係、遺伝子検査係、病理生化学係に改編。

2 所在地及び交通

所在地 〒371-0103 群馬県前橋市富士見町小暮 2425-3
電話番号 : 027-288-2106 FAX 番号 : 027-288-2161
E-mail : kachikuken@pref.gunma.lg.jp
赤城山南麓の標高 367m に位置し、国道 353 号線の北側、群馬県畜産試験場に隣接。

交通 JR 前橋駅から『富士見温泉』または『赤城山ビジターセンター』行きバスに乗り、「畜産試験場入口」で下車。国道 353 号線と県道前橋・赤城線の交差点の東方約 300m (徒歩約 5 分)。



3 用地及び建物等

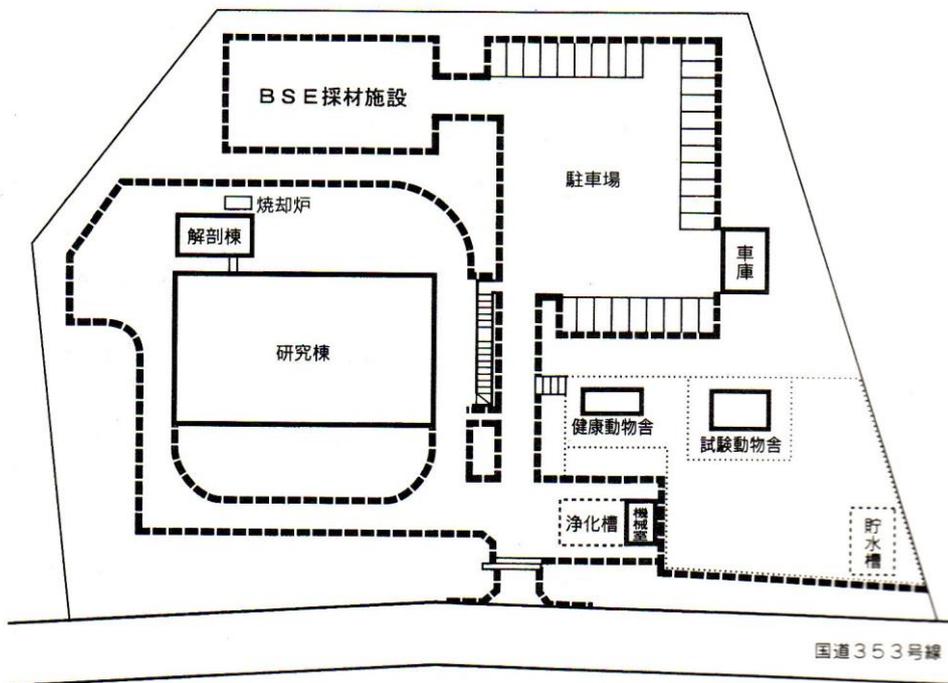
(1) 用地 10,000 m²

(2) 建物	研究棟（解剖棟を含む）	R C造 2階建て	1,414.0	m ²
	健康動物舎	木造	30.8	m ²
	試験動物舎	R C造+木造	50.1	m ²
	B S E採材施設	R C造・プレハブ	44.3	m ²
	車庫・物置	S造	54.0	m ²
	排水処理施設	R C造	16.7	m ²

(3) 特殊設備

水道水貯留加压施設	1
焼却炉	1
自家発電装置	1
クリーンルーム	3（ウイルス検査室：2 細菌検査室：1）
冷蔵保存室	2
冷凍保存室	1
死亡牛保管施設	冷凍機付コンテナ（40フィート×4）

建物配置図

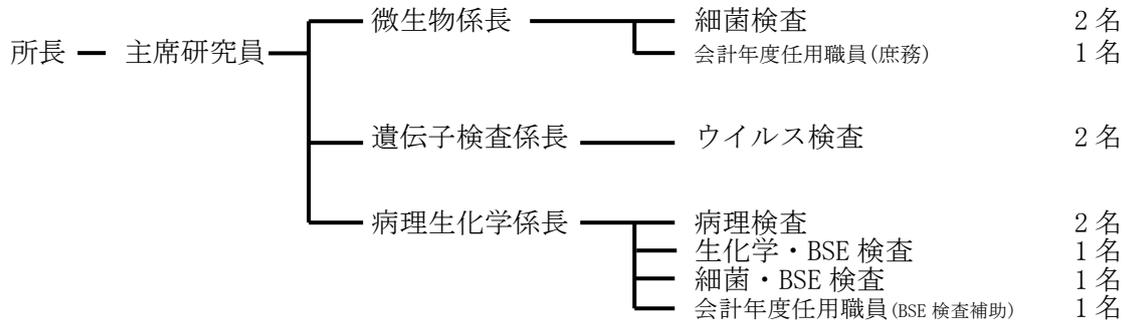


(4)重要物品

物品名称	規格(車名)	数量
超純水製造装置	バイオタイプ	1
リアルタイムPCRシステム	MX3000P ASSEMBLY	1
リアルタイムPCRシステム	ABI社製 7500Fast	1
リアルタイムPCRシステム	ABI社製 QuantStudio5	1
全自動核酸抽出装置	magLEAD 12gC	1
超微量紫外可視分光光度計	NanoDrop One UV-VIS	1
パルスフィールド電気泳動システム一式	DR-2 CHEF-DR2	1
マイクロプレートウォッシャー	MW-96FR	1
マイクロプレートリーダー	MultiskanFCベーシック	1
マイクロプレートリーダー	quant MQX200	1
多本架遠心機	トミー精工 EX-136	1
多本架冷却遠心機	トミー精工 AX-521	1
多本架冷却遠心機	久保田製作所 Model5920	1
縦型超低温フリーザー	日本フリーザー	1
超低温フリーザー	サンヨーMDF-792AT	1
超低温フリーザー	日本フリーザーCLN-50CD2	1
恒温培養器	ヒラサワ テーハー式電気孵卵器 HD-16-CP(2)	2
多検体細胞破碎機	バイオラット社製グラインディングチューブ対応	1
多検体細胞破碎機	安井器械 MBJ1024YN	1
パラフィン包埋ブロック作製装置	ディスペンシングコンソール 4 型式4672	1
密閉式自動固定包埋装置	ティッシュプロセッサASP200S	1
凍結マイクロトーム	ライカCM1860UV	1
自動染色装置	ティッシュ・テック DRS-2000-B	1
倒立型蛍光顕微鏡一式	カールツァイス Axiovert 135	1
倒立型位相差蛍光顕微鏡用蛍光観察用カメラ	AxioCam 503mono	1
蛍光顕微鏡	ニコン VED-R	1
蛍光顕微鏡	ニコン E600 E6F-FL-DIC	1
デジタルカメラ付き生物顕微鏡	6本対物レンズ同時装着 超広視野三眼	1
顕微鏡用写真撮影装置	オリンパスDP27-C	1
動物用自動血球計数装置	シスメックス製 pocH-100iV Diff	1
生化学分析装置	富士ドライケム3500	1
自記分光光度計一式	日立 U-3300	1
日立分光蛍光光度計	F-2000	1
デンシトメーター	デンシトロンCR20	1
高速液体クロマトグラフィー	並列ダブルプランジャー方式100 μ L \times 2、セミミク	1
超音波洗浄装置	シャープ製 UC-600A	1
安全キャビネット	ダルトン製 NSC-2B2-1200	1
冷凍コンテナ	40フィート型(4)、20フィート型(1)	5
冷凍コンテナローラーベルトコンベアー等	40フィート型コンテナ用	4
紫外線光触媒脱臭装置	日本施設(株) 40フィートコンテナ用	4
家畜電気屠殺装置	ST-EC-2	2
小型貨物自動車	トヨタダイナ 木製 1.5t ジャストロー	1
小型貨物自動車	ニッサンADバン	1
車輛消毒装置	スタンダーアーチ SA-4540-15	1
フォークリフト		1
高温水高圧洗浄機	ジェットマン FHP-1615	1
高温水高圧洗浄機	蔵王産業(株)製 PWH2016D型	1
プレハブ冷蔵庫(クーリングユニット含む)	2坪	1
可搬式簡易電殺機	STUN-E513	7

4 機構及び人員

(1) 組織図



(2) 職員名簿

職 名	氏 名
所長 (技)	吉田 晶徳
首席研究員	渋谷 由美
微生物係	
微生物係長	森口 充代
細菌検査 (独立研究員)	高梨 資子
細菌検査 (技師)	古屋 裕崇
遺伝子検査係	
遺伝子検査係長	吉田 幸代
ウイルス検査 (主任)	茂木 麻奈美
ウイルス検査 (技師)	清水 誠之
病理生化学係	
病理生化学係長 (主任研究員)	瀧澤 勝敏
生化学・BSE検査 (独立研究員)	河合 優子
病理検査 (技師)	原田 奈美香
微生物・BSE検査	荒井 葵
病理検査 (技師)	小材 幸雄
会計年度任用職員 (庶務業務)	竹内 実希
会計年度任用職員 (BSE検査補助)	二瓶 忠一
会計年度任用職員 (BSE検査補助)	林 京子

5 業務

- (1) 家畜保健衛生所が行う病性鑑定、検査、試験等の技術的調整に関すること。
- (2) 家畜疾病の病性鑑定に関すること。
- (3) 家畜衛生に係る試験研究および調査に関すること。
- (4) その他病性鑑定技術の研修および家畜衛生の向上に関すること。
- (5) 牛、めん羊、山羊、水牛およびしかの伝達性海綿状脳症診断に関すること。

6 令和3年度病性鑑定実績

(1) 依頼者・畜種別病性鑑定

畜種	依頼者区分	家衛研への直接依頼					家畜保健衛生所を経由									合計
		家畜衛生研究所	その他の県機関	市町村	その他	小計	その他の県機関	市町村	農協等団体・共済	民間獣医師	飼養者	流通関係業者	と畜場食鳥処理場	その他	小計	
乳用牛	件数	0	0	0	0	0	25	0	0	0	458	0	0	0	483	483
	頭数	0	0	0	0	0	54	0	0	0	10,671	0	0	0	10,725	10,725
肉用牛	件数	0	0	0	0	0	19	0	1	0	242	0	0	0	262	262
	頭数	0	0	0	0	0	36	0	7	0	862	0	0	0	905	905
馬	件数	0	0	0	0	0	1	0	0	1	4	0	0	0	6	6
	頭数	0	0	0	0	0	1	0	0	1	4	0	0	0	6	6
豚	件数	0	0	0	0	0	54	0	0	0	104	0	0	0	158	158
	頭数	0	0	0	0	0	11,428	0	0	0	4,171	0	0	0	15,599	15,599
緬山羊	件数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40	0	0	0	40	40
	羽数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	83	0	0	0	83	83
鶏	件数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	62	0	0	0	62	62
	頭数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,723	0	0	0	1,723	1,723
その他	件数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0	0	14	28	28
	頭数	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1,123	0	0	161	1,284	1,284
計	件数	0	0	0	0	0	99	0	1	1	924	0	0	14	1,039	1,039
	頭数	0	0	0	0	0	11,519	0	7	1	18,637	0	0	161	30,325	30,325

(2) 項目・畜種別病性鑑定

区 分		細 菌	ウイルス	寄生虫	生化学	臨床※	病 理	その他	計
乳用牛	件数	331	110	13	33	23	39	4	553
	頭数	9,488	1,183	101	59	31	45	6	10,913
	項目数	355	130	17	36	44	66	4	652
肉用牛	件数	130	102	15	26	9	60	3	345
	頭数	550	299	24	69	10	61	3	1,016
	項目数	151	120	17	29	16	93	4	430
馬	件数	0	0	0	0	0	6	0	6
	頭数	0	0	0	0	0	6	0	6
	項目数	0	0	0	0	0	7	0	7
豚	件数	12	154	0	0	20	13	0	199
	頭数	154	15,469	0	0	1,051	168	0	16,842
	項目数	20	180	0	0	30	27	0	257
緬山羊	件数	5	8	2	3	3	8	26	55
	頭数	9	39	2	13	13	9	27	112
	項目数	6	10	2	3	3	11	25	60
鶏	件数	1	61	0	0	0	2	0	64
	頭数	10	1,721	0	0	0	12	0	1,743
	項目数	1	61	0	0	0	4	0	66
その他	件数	7	33	0	0	0	0	0	40
	頭数	21	1,287	0	0	0	0	0	1,308
	項目数	13	34	0	0	0	0	0	47
合計	件数	486	468	30	62	55	128	33	1,262
	頭数	10,232	19,998	127	141	1,105	301	36	31,940
	項目数	546	535	36	68	93	208	33	1,519

※臨床：血液一般検査

(3) 家畜伝染病・届出伝染病等診断状況

疾病名	畜種	件数	頭数	備考
ヨーネ病 (定量陽性)	乳用牛	4	5	【法】
牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛	乳用牛	1	1	【届】
牛伝染性リンパ腫	乳用牛	11	11	【届】
牛伝染性鼻気管炎	乳用牛	1	5	【届】
ネオスポラ症	乳用牛	2	5	【届】
右後肢大腿部の筋肉の断裂及び剥離	乳用牛	1	1	
壊死性化膿性肺炎	乳用牛	1	1	
空腸中部における潰瘍	乳用牛	1	1	
後大静脈血栓症	乳用牛	1	1	
乳房炎	乳用牛	2	2	
肺胸膜における線維化	乳用牛	1	1	
脊柱背側彎症 大腸菌による敗血症	乳用牛	1	1	
牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛	肉用牛	4	4	【届】
悪性水腫	肉用牛	1	2	
牛大腸菌症	肉用牛	1	1	
牛パスツレラ (マンヘミア) 症	肉用牛	1	1	
ヒストフィルス・ソムニ感染症	肉用牛	2	2	
<i>Fusobacterium necrophorum</i> による肝膿瘍 肺膿瘍および壊死性肺炎	肉用牛	1	1	
<i>Mannheimia varigena</i> による化膿性臍動静脈炎 線維素性腹膜炎 線維素性胸膜炎	肉用牛	1	1	
<i>Mycoplasma bovis</i> による髄膜脳炎 中耳炎 内耳炎	肉用牛	1	1	
<i>Streptococcus parasuis</i> による線維素性化膿性臍帯周囲炎	肉用牛	1	1	
右肺における線維性滲出性胸膜炎 右肺における胸水による圧迫性無気肺	肉用牛	1	1	
下垂体膿瘍	肉用牛	1	1	
気管支間質性肺炎	肉用牛	1	1	
空腸における捻転	肉用牛	1	1	
空腸中部におけるイレウス	肉用牛	1	1	
誤嚥性肺炎	肉用牛	1	1	
口蓋裂	肉用牛	1	1	
重度な腹水の貯留を伴う線維素性腹膜炎。重度な胸水の貯留を伴う線維素性胸膜炎。	肉用牛	1	1	
心室中隔欠損	肉用牛	1	1	
線維性胸膜肺炎 臍帯周囲の被包化膿瘍	肉用牛	1	1	
線維素性腹膜炎	肉用牛	1	1	
線維素性腹膜炎 線維素性胸膜炎	肉用牛	1	1	
大腸菌および <i>Klebsiella pneumoniae</i> による髄膜脳炎	肉用牛	1	1	
第13胸椎 第1腰椎の椎孔における膿瘍の形成	肉用牛	1	1	
第一胃食滞	肉用牛	1	1	
第四胃幽門部における潰瘍形成による胃穿孔 線維性腹膜炎 第四胃および空腸の変位	肉用牛	1	1	
頭蓋裂 正中唇裂 口蓋裂 髄膜瘤	肉用牛	1	1	
尿路結石	肉用牛	1	1	
豚熱	豚	4	46	【法】
豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS)	豚	1	1	【届】
豚増殖性腸炎+豚繁殖・呼吸障害症候群+バランチジウム症+軽度なニューモシスティス肺炎	豚	1	1	【届】
豚赤痢+豚繁殖・呼吸障害症候群+軽度な豚胸膜肺炎	豚	1	1	【届】
豚流行性下痢	豚	1	2	【届】
豚胸膜肺炎	豚	1	1	
ワクモの重度寄生 卵嚢性腹膜炎	鶏	1	2	
下顎左側第三臼歯における外歯瘻	馬	1	1	
回腸における絞扼性イレウス	馬	1	1	
回腸の絞扼	馬	1	1	
腫瘍	馬	1	1	
ブルータング	緬羊	1	1	
結腸の捻転	緬羊	1	1	
TSE陰性 (スクレイパーは否定) 大脳皮質壊死症	緬羊	1	1	
第四胃穿孔	山羊	1	1	
小腸における条虫寄生	めん羊	1	1	
盲腸における鞭虫寄生	山羊	2	2	
盲腸における線虫寄生	山羊	1	2	
アメリカ腐蛆病	みつばち	1	1	【法】
豚熱ウイルス感染を疑う	いのしし	4	5	【法】
肺胸膜および肋骨胸膜における径2~5mmの乳白色結節の多発	いのしし	1	1	
総排泄腔と思われる部位における結石の充満	野鳥	1	1	

7 令和3年度牛海綿状脳症検査実績

(1) BSE検査実施状況

家保別	死亡牛			病性鑑定			合計		
	乳用牛	肉用牛	計	乳用牛	肉用牛	計	乳用牛	肉用牛	計
中部	127	22	149	5	1	6	132	23	155
西部	73	18	91	3	2	5	76	20	96
吾妻	58	10	68	5	0	5	63	10	73
利根沼田	30	2	32	2	0	2	32	2	34
東部	55	22	77	1	1	2	56	23	79
県内合計	343	74	417	16	4	20	359	78	437
県外	0	1	0	0	0	0	0	1	1

(2) 月別BSE検体搬入状況

	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	合計
頭数	26	34	32	35	45	50	41	27	37	40	31	40	438
対前年比%	81.3	89.5	80.0	83.3	57.7	108.7	117.1	71.1	100.0	121.2	81.6	114.3	89.0

令和3年度は合計438頭のBSE検査を実施した。乳用牛は359頭（82.2%）、肉用牛は78頭（17.8%）であった。

月別検体搬入状況は、8月から10月にかけて増加傾向であった。

8 職員研修

(1) 家畜衛生講習会

開催日	名称等	参加者	開催場所
5月11日～ 12月10日	家畜衛生講習会（病性鑑定特殊講習会）	清水 誠之	農研機構動物衛生研究部門
9月2日～ 9月3日	家畜衛生講習会（総合講習）	吉田 晶徳	Web

(2) 家畜衛生研修会

開催日	名称等	参加者	開催場所
10月5日～ 10月8日	家畜衛生研修会（病性鑑定：生化学部門）	なし	農研機構動物衛生研究部門
10月12日～ 10月15日	家畜衛生研修会（病性鑑定：ウイルス部門）	茂木 麻奈美	Web
10月19日～ 10月22日	家畜衛生研修会（病性鑑定：細菌部門）	古屋 裕崇	Web
10月26日～ 10月29日	家畜衛生研修会（病性鑑定：病理部門）	瀧澤 勝敏	Web

(3) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所研修(病態研究領域事務局)

開催日	名称等	参加者	開催場所
中止	つくば病理談話会	なし	農研機構動物衛生研究部門

(4) 研修会参加

1月11日～ 1月14日	豚ブルセラ病抗体検査研修	古屋 裕崇	農研機構動物衛生研究部門
2月17日	動物衛生試験場研究推進会議	森口 充代	Web

(5) 中央畜産技術研修

開催日	名称等	参加者	開催場所
		なし	家畜改良センター 中央畜産研修施設

(6) その他の研修

ア 一般研修

開催日	名称等	参加者	開催場所
4月22日 5月11日 6月23日	新任管理職研修	渋谷 由美	群馬県公社総合ビル
10月22日 11月8日	主幹キャリアアップ研修	高梨 資子	群馬県公社総合ビル

イ 安全管理・技能講習

開催日	名称等	参加者	開催場所
5月25日 5月26日 5月27日 5月28日	フォークリフト運転技術講習	吉田 幸代	ぐんまフォークリフトセンター
8月30日 8月31日	フォークリフト運転技術講習	吉田 晶徳	コマツ教習所群馬センター

ウ 技術研修

開催日	名称等	参加者	開催場所
6月16日	日生研オンライン養鶏セミナー	吉田 晶徳	Web
6月26日	日本家畜衛生学会第93回大会	吉田 晶徳	Web
8月5日	豚熱ワクチンを考える会 第2回研修会	吉田 晶徳	Web
8月11日	移動式レンダリング装置の活用に関わる全国会議	原田 奈美香	Web
9月12日	日本獣医師会獣医学術学会	吉田 晶徳 森口 充代 高梨 資子	Web
9月16日～ 9月17日	令和3年度全国家畜保健衛生所業績発表会	古屋 裕崇	関東農政局群馬拠点
11月12日	全国鶏病技術研修会	吉田 晶徳	Web
11月16日	豚熱ワクチンを考える会 第2回研修会	吉田 晶徳 森口 充代 高梨 資子 古屋 裕崇 吉田 幸代 茂木 麻奈美 瀧澤 勝敏 河合 優子 原田 奈美香 小材 幸雄	Web
1月26日	群馬県家畜保健衛生所業績発表会	古屋 裕崇 茂木 麻奈美	群馬県庁
2月2日	令和3年度畜産試験場成果発表会	吉田 晶徳	群馬会館
2月25日	マイコプラズマセミナー	吉田 晶徳	Web
3月9日	世界のアニマルウェルフェアの現状	吉田 晶徳	Web
3月10日	各国における食肉代替食品の消費動向	吉田 晶徳	Web
3月14日	移動式レンダリング装置活用に関する説明会	吉田 晶徳	Web
3月18日	ねずみ駆除協議会 研修会	吉田 晶徳	Web
3月23日	令和3年度家畜衛生伝達講習会	瀧澤 勝敏 茂木 麻奈美 清水 誠之 古屋 裕崇	群馬県庁

9 付帯業務

(1) 講習会等への講師派遣

開催日	名称等	参加者	開催場所
6月9日	豚採血、採材、電殺実習	中部2名、畜試1名、家衛研4名	家畜衛生研究所
10月7日	CSF-realttimePCR技術指導	茂木 麻奈美	
10月7日	細菌学的検査の基本研修	中部1名、西部2名 吾妻1名、東部1名、浅間牧場1名	

(2) 県外への防疫業務等の派遣

開催日	名称等	派遣者	派遣先
4月26日～ 4月28日	豚熱発生に伴う防疫作業	森口 充代	栃木県
5月3日～ 5月5日	豚熱発生に伴う防疫作業	森口 充代	栃木県
5月12日～ 5月14日	豚熱発生に伴う防疫作業	吉田 晶徳	山梨県
12月13日～ 12月15日	豚熱発生に伴う防疫作業	古屋 裕崇	宮城県

(3) 会議参加

開催日	名称等	参加者	開催場所
7月12日	職場安全講習会	森口 充代	畜産試験場 研修棟
7月13日	行政対象暴力対策責任者研修	渋谷 由美	群馬会館 大ホール
8月5日	県職員研修「データ分析力向上」	吉田 晶徳 茂木 麻奈美	Web
10月12日	県市町村職員合同研修「論理的な話し方」	吉田 晶徳	Web
12月22日	地域豚疾病会議	茂木 麻奈美	農協ビル
2月8日	電子マニフェスト講習会	瀧澤 勝敏	Web

(4) 支援業務等の参加

開催日	名称等	参加者	派遣先
4月3日～ 4月4日	CSF発生に伴う防疫作業	吉田 晶徳	前橋市内養豚場
4月8日 4月21日 4月22日 5月19日 10月27日	浅間家畜育成牧場入退牧支援	吉田 晶徳 高梨 資子 森口 充代 古屋 裕崇 吉田 晶徳	浅間家畜育成牧場
8月 9日 8月10日 8月11日 8月14日 8月15日 8月16日 8月20日 8月21日 8月22日 8月23日	CSF発生に伴う防疫作業	吉田 晶徳 森口 充代 古屋 裕崇 瀧澤 勝敏	桐生市内養豚場
10月21日	CSF発生に伴う防疫作業	吉田 晶徳 高梨 資子 森口 充代 古屋 裕崇 吉田 晶徳	前橋市内養豚場
11月29日～ 11月30日	CSF発生に伴う防疫作業	瀧澤 勝敏 吉田 晶徳	桐生市内養豚場

(5) 視察

期間	内容等	所属	人数
		なし	

(6) 研修生・学生実習受け入れ

期間	研修内容等	学校名	人数
		なし	

1 0 令和3年度学会・研究会（研修会）発表

令和3年度群馬県家畜保健衛生業績発表会

県庁4階ウェブ会議利用スペースからオンライン開催
豚熱抗体検査におけるELISA S/P値と中和抗体価の関係

遺伝子検査係 茂木 麻奈美

牛の肺炎病巣から分離された*Mannheimia*属菌の性状解析

微生物係 古屋 裕崇

神経指向性アストロウイルスが検出された牛の非化膿性脳炎

病理生化学係 原田 奈美香

第62回関東甲信越ブロック家畜保健衛生業績発表会

令和4年2月14日（月）から 於：書面開催
牛の肺炎病巣から分離された*Mannheimia*属菌の性状解析

微生物係 古屋 裕崇

令和3年度関東・東京合同地区獣医師大会・三学会

令和4年1月21日（金）から令和4年2月6日（日） 於：Confitによるオンデマンド配信

1 1 令和3年度誌上発表

日本獣医師会雑誌, Vol. 74, p 642, 2021
子牛の *Aspergillus* 属真菌による多発性血栓形成を伴う壊死性化膿性肺炎

瀧澤 勝敏

1 2 令和3年度家畜衛生研修会発表症例

新型コロナウイルス感染症のため開催が中止になった。

13 令和2年度群馬県家畜保健衛生業績発表

豚熱抗体検査における ELISA S/P 値と中和抗体価の関係

家畜衛生研究所 茂木麻奈美 吉田幸代

豚熱（CSF）は CSF ウイルスにより起こる豚、いのししの熱性伝染病で、強い伝染力と高い致死率を示す。平成 30 年 9 月に 26 年ぶりに国内で発生があり、県内でも 5 例の発生が確認されている。令和元年 10 月からワクチン接種が開始され、免疫付与状況の確認や接種適期の推定に抗体検査が行われている。CSF の抗体検査は、ELISA 検査と中和試験が実施されているが、ELISA 検査は迅速だが定性的、中和試験は定量的だが煩雑で結果が判明するまでに時間を要する。そのため回帰直線により ELISA S/P 値（ELISA 値）から中和抗体価（抗体価）の推測が全国的に行われている。しかし、検査結果のばらつきが大きく回帰直線から大きく離れた検査値が認められること、都道府県ごとに回帰直線の傾き・切片が異なることから都道府県ごとに検査結果を慎重に精査し、関係式を設定することとなっている¹⁾。

そこで、県内においても ELISA 値から抗体価の推測が行われているため、これらの関係に影響を及ぼす要因を検討した。

材料及び方法

1 検査材料・方法

令和 2 年 7 月から令和 3 年 11 月に採材された県内養豚場 42 戸 1,545 検体の血清（表 1）。

（1）CSF 中和試験

当所において CPK-NS 細胞及び CSF ウイルス GPE-株を用いて実施した。

（2）CSF-ELISA 検査

各家畜保健衛生所及び当所の 6 機関において、豚熱エライザキット II（（株）ニッポンジーン）及び旧製品豚コレラエライザキット II（（株）JNC）の 8 種類のロットを用いて実施した。

2 解析方法

ELISA 値と抗体価の関係に影響を及ぼす要因には ELISA 検査のみでなく中和試験も関係するが、中和試験は全検体当所で実施し、使用した細胞株及びウイルス株

表 1 検査実施検体の内訳

検査機関	A	B	C	D	E	F	合計
繁殖	12	43		1	10	163	229
肥育	665	161	120	12	264	94	1,316
合計	677	204	120	13	274	257	1,545

は同一であることから ELISA 検査の要因を中心に、ELISA 検査実施機関（検査機関）、ELISA キットのロット、農場及び肥育豚・繁殖豚別（豚区分）ごとの回帰直線について比較を行った。ELISA キットのロット、豚区分、農場の比較においては、当該要因以外の 3 要因が同一な検体を抽出して解析を行った。

検査機関での比較

1 機関（検査機関 F）については検査数が少なく、偏りがあったため除外し、5 つの検査機関で ELISA 検査を実施した 1,532 検体を用いた。

ELISA キットのロットでの比較

検査機関 A で行った農場アの肥育豚 356 検体（ロット①：119 検体、ロット②：159 検体、ロット③：36 検体、ロット④：42 検体）について 4 種類のロットで行った。

農場の比較

検査機関 A でロット④を用いて検査した肥育豚 124 検体の 6 農場（農場ア：42 検体、農場イ：10 検体、農場ウ：30 検体、エ農場：22 検体、オ農場：10 検体、農場カ：10 検体）（例①）及び検査機関 A でロット③を用いて検査した肥育豚 98 検体の 6 農場（農場ア：36 検体、農場キ：11 検体、農場ク：11 検体、農場ケ：12 検体、農場コ：8 検体、農場サ：5 検体）（例②）で行った。

豚区分での比較

検査機関 F でロット②を用いて検査した農場シの 172 検体（肥育豚：82 頭、繁殖豚：90 頭）及び検査機関 E でロット⑤で検査した農場スの 65 検体（肥育豚：55 頭、繁殖豚：10 頭）で行った。

結果

1 全検体の ELISA 値と抗体価の関係

検査を実施した全 1,545 検体の ELISA 値と抗体価の関係を図 1 に示す。ELISA 値と抗体価には強い相関が見られた ($r=0.84$)。回帰直線は(ELISA 値) $=0.1009 \times \log_2(\text{抗体価}) - 0.1155$ となり、決定係数 $R^2 = 0.70$ であった。

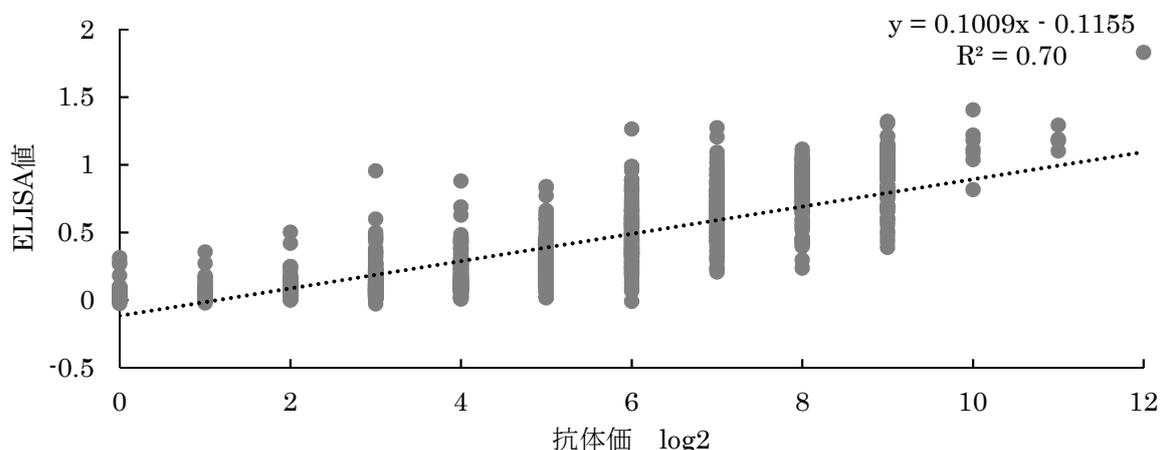


図1 全検体の ELISA 値と抗体価の関係

2 ELISA 検査実施機関での比較

5つの検査機関で ELISA 検査を実施した 1,532 検体について、各検査機関の ELISA 値と抗体価を図 2 に示す。各検査機関の回帰直線の傾きには差がみられた(図 3)。最も傾きに差がみられる検査機関 E と F では、ELISA 値 0.5 の時に推定される抗体価は検査機関 E で 177.4 倍、F で 40.6 倍となり、ELISA 値 0.5 以上では 2 管以上の差が認められた。また、全体(1545 検体)の回帰直線で ELISA 値が 0.75 の時に推定される抗体価(382.1 倍)と各検査機関の回帰直線で推定される抗体価は検査機関 E (1611.8 倍)で差が最大となり、2 管以上の差となった。また、これらの差は ELISA 値が高くなるほど大きくなった。

3 ELISA キットのロットでの比較

ロットごとの ELISA 値と抗体価の回帰直線の傾きには差が認められた(図 4)。ELISA 値が 0.1 付近で各ロットの抗体価の差は小さく、ELISA 値が低くもしくは高くなると各ロットの推定抗体価の差は大きくなった。ELISA 値 0.6 の時に推定抗体価はロット②で 299.3 倍、ロット③で 65.3 倍となり、2 管以上の差が認められた。

4 農場での比較

検査機関 A でロット④を用いて検査した肥育豚 124 検体の 6 農場の例①において、農場ごとの ELISA 値と抗体価の回帰直線の傾き及び切片に差は認められなかったが、検査機関 A でロット③を用いて検査した肥育豚 98 検体の 6 農場の例②においては ELISA 値と抗体価の回帰直線の傾きに差が認められた(図 5)。例②では、ELISA 値がいくつであっても農場間の推定抗体価の最大差は 2 管以上で、ELISA 値が高くなると農場ごとの推定抗体価の差は大きくなった。

5 肥育豚と繁殖豚の比較

農場シ、農場スの検体において肥育豚と繁殖豚ごとの ELISA 値と抗体価の回帰直線の傾きには差が認められた(図 6)。区分間の推定抗体価の差は ELISA 値がそれぞれ農場シで 0.24、農場スで 0.2 の時に最小となり、ELISA 値が低くもしくは高くなると各区分の推定抗体価の差は大きくなった。農場シでは ELISA 値 0.7 以上で、農場スでは 0 以下及び 0.4 以上で区分ごとの推定抗体価の差はいずれも 2 管以上の差となった。

考察

今回検査を実施した 1,545 検体の ELISA 値と抗体価は強い相関を示し、回帰直線の決定係数が 0.70 であることから、回帰直線によって ELISA 値から抗体価の推定が可能であることを確認できた。

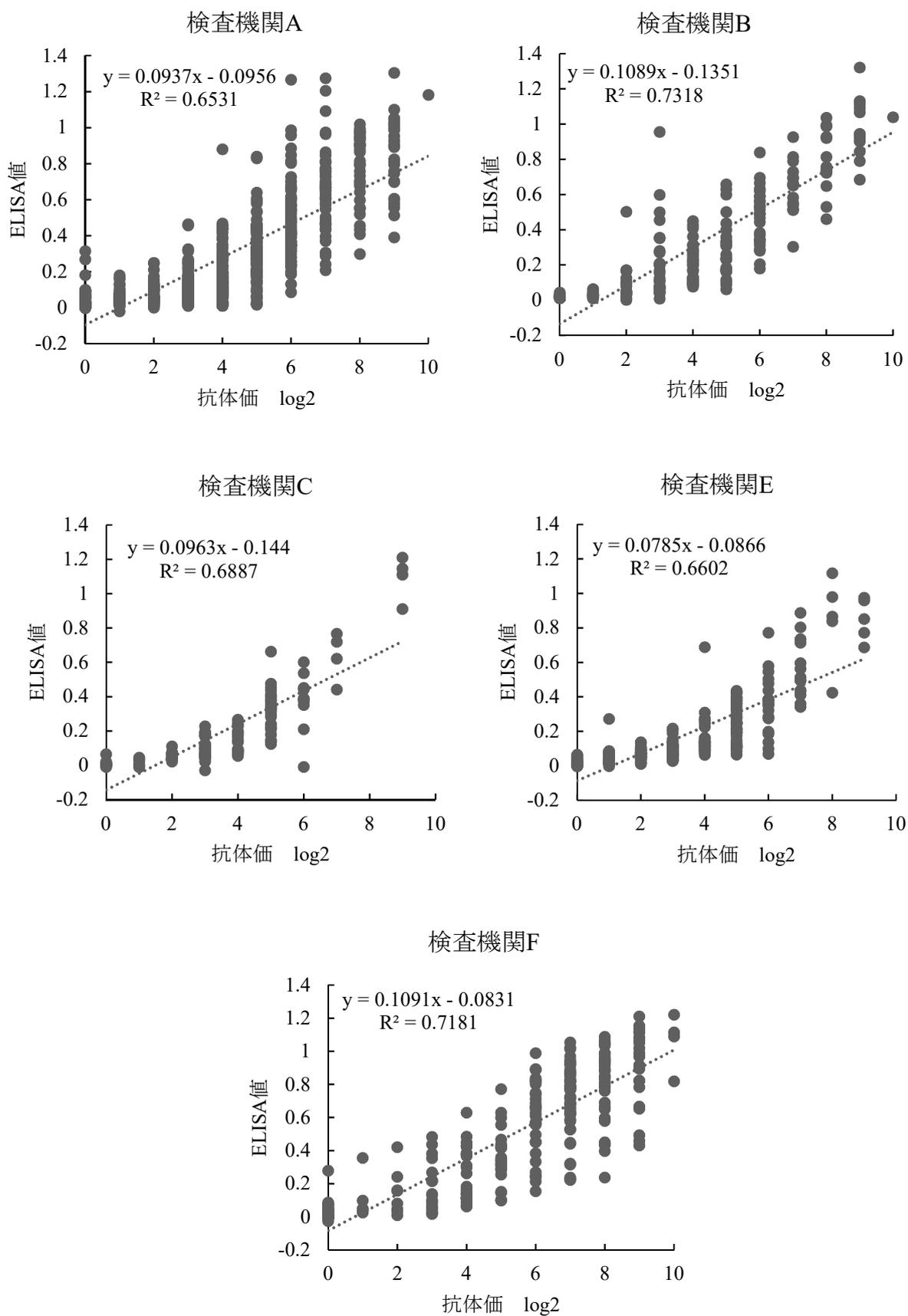


図2 各検査機関の ELISA 値と抗体価の関係

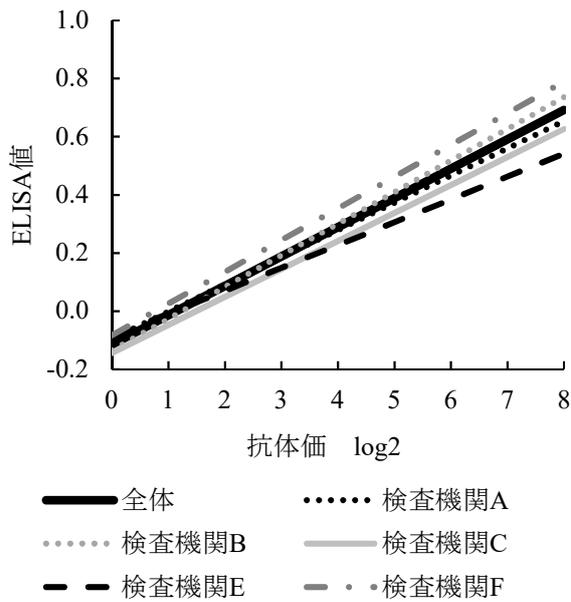


図3 各機関の ELISA 値と抗体価の回帰直線

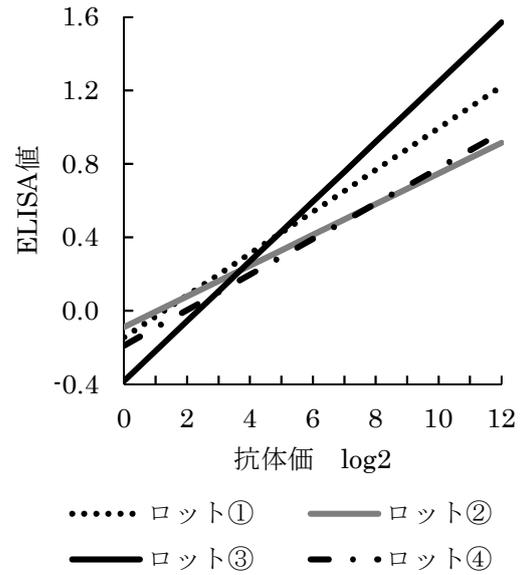


図4 各 ELISA キットのロットの ELISA 値と抗体価の回帰直線

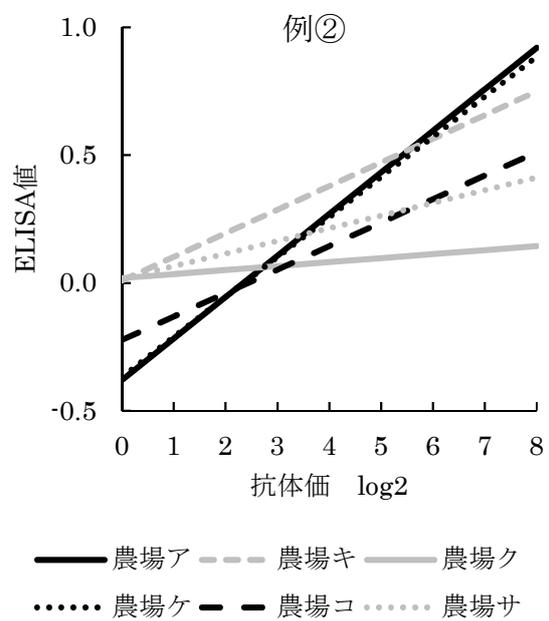
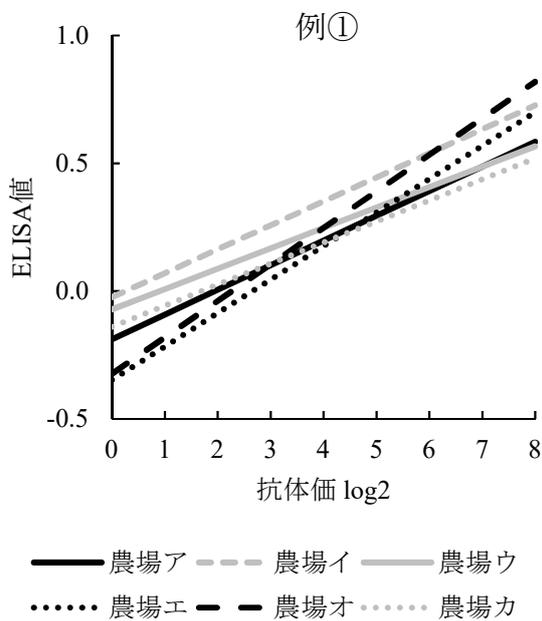


図5 農場の ELISA 値と抗体価の関係 (例①、例②)

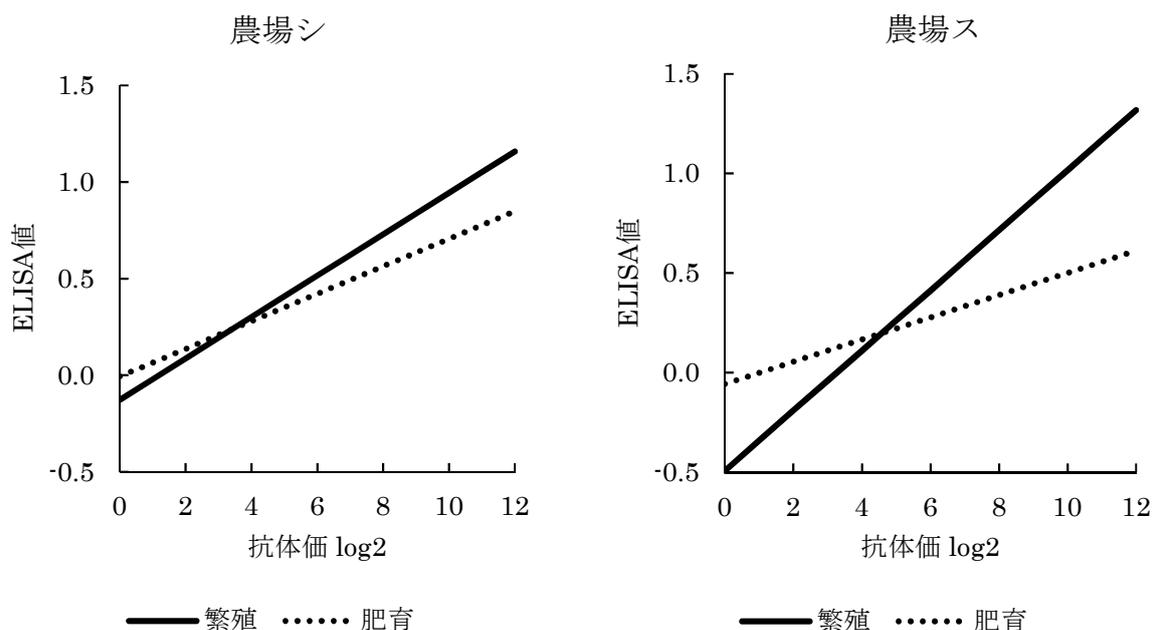


図6 豚区分の ELISA 値と抗体価の関係（農場シ、農場ス）

検査機関ごとの回帰直線の傾きには差があり、特に ELISA 値が高くなると推定抗体価の差は大きくなった。CSF の ELISA に限らず、一般的に ELISA 値に影響する要因は検査に使用するピペットやプレートリーダー等の機器、検査室の温度や湿度、検査実施者の技量、溶血などの検体の状態、検体の保存状態に影響される²⁾。また、各検査機関である家畜保健衛生所では、各管内農場の検体を検査しているため、検査に用いた個別農場の傾向が検査機関ごとの影響として現れた可能性も考えられた。

ロットごとの検討においては、回帰直線の傾きに差が見られ、特に ELISA 値が高くなると推定抗体価の差が大きくなった。このことから、ELISA キットのロットによって差があり、ELISA 検査のロットが変わる際には、他のロットとの結果を比較するなどの確認が必要である。

また、農場ごとの検討においては、各農場の回帰直線の傾きに差がみられる例があり、農場により推定抗体価に差が生じる可能性が示唆された。農場による差は、豚の品種及び血統の違いが影響した可能性が考えられた。より正確な抗体価を推測するためには、農場ごとの回帰直線を作成する必要がある。

さらに、豚区分ごとの検討においても、肥育豚と繁殖豚で差がみられ、検討を行った 2 農場いずれも繁殖豚で回帰直線の傾きが大きくなった。繁殖豚と肥育豚の差は、繁殖豚はワクチンによる獲得抗体のみであるのに対し、肥育豚には移行抗体と獲得抗体の両方が存在することが影響している可能性がある。

今回の結果では ELISA 値と抗体価の関係には、検査機関、ELISA キットのロット、豚区分及び農場が影響を及ぼす可能性が示唆された。しかし、検体数が少な

いため要因が ELISA 値と抗体価の関係にどの程度影響するかは断定できなかった。ELISA 値から推測される抗体価は目安として利用可能であるが、高抗体価の検体では影響が大きくなるため注意が必要であり、状況に応じて中和試験を実施することが望ましい。今後は同一農場での豚区分ごとの検体数に偏りのない採材や、同一検体の複数検査機関、複数ロットでの検査等の試験計画を作成し、要因との関係性をより明確にしていきたい。

引用文献

農林水産省：食料・農業・農村政策審議会 家畜衛生部会 第 74 回牛豚等疾病小委員会配布資料

https://www.maff.go.jp/j/council/seisaku/eisei/usibuta_sippe/74/attach/pdf/index-17.pdf

2) 若林克己：ELISA 誤差・変動について, <https://シバヤギ.com/webinar/elisa-bv.html>

牛の肺炎病巣から分離された *Mannheimia* 属菌の性状解析

家畜衛生研究所 古屋裕崇、原田奈美香、高梨資子

牛呼吸器複合病(以下 BRDC)は様々な病原体の複合感染による疾病であり、有効な防除や治療のためには原因病原体を正確に把握することが基本となる。病原体の中でも *Mannheimia* 属菌は BRDC の主要な病原体であり、その中でも *Mannheimia haemolytica* はロイコトキシンを産生し、重篤な肺炎病巣を形成する。勝田ら⁴⁾によれば、国内で分離された *Mannheimia* 属菌について 16S rRNA 遺伝子解析により菌種の再同定を実施した結果、菌種を確定することができない *Mannheimia* 属菌が含まれていたと報告した。また、市川ら²⁾は子牛の腸炎症例に *Mannheimia varigena* と菌種未確定の *Mannheimia* 属菌が関与したと報告した。これらのことから、菌種未確定の *Mannheimia* 属菌はその性状が不明であるため、防疫対策の必要性を検討する上で障害となっている。今回、肺炎を呈し死亡した子牛の肺から、菌種未確定の *Mannheimia* 属菌を分離し、その性状解析を実施したので報告する。

症例概要

肉用牛約 600 頭を飼養する育成農場において、令和元年 8 月、生後 7 日から 20 日齢で下痢および脱水症状を呈して死亡する子牛が増加し、一部の子牛は対症療法で治癒した。しかし、約 2 か月齢程度で死亡する子牛も散見されたため、同年 12 月に 2 か月齢で死亡した子牛の病性鑑定を実施した。

材料及び方法

1 細菌学的検査

(1)細菌分離および生化学性状試験

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、大脳および空腸内容について、コロンビア 5%羊血液寒天培地(ベクトン・ディッキンソン社)を用いて 37°C、5%炭酸ガス下、24 時間培養を行った。また、DHL 寒天培地(栄研化学株式会社)を用いて 37°C、好気、24 時間培養を行った。分離細菌について、簡易同定キット(ID テスト・HN-20 ラピッド「日水製薬株式会社」、API・コリネ「バイオメリュー・ジャパン株式会社」)による生化学性状試験を実施した。コロンビア 5%羊血液寒天培地で β 溶血し、カタラーゼ陽性であった細菌(以下、本菌)について、*Mannheimia* 属菌の菌種同定のため L-アラビノース、D-ソルビトール、エスクリンの糖分解試験を追加で実施した。また空腸内容をハーナ・テトラチオン酸塩液体培地(栄研化学株式会社)で増菌後、ノボビオシン添加 DHL 寒天培地にてサルモネラ分離を実施した。

(2)遺伝子検査

本菌について、その菌種を正確に同定するため、病性鑑定マニュアル記載の *Mannheimia* 属菌種同定用 PCR¹⁾、16S rRNA 遺伝子解析を実施した。16S rRNA 遺伝子解析により得られた塩基配列は EzBioCloud

〈<https://www.ezbiocloud.net/>〉を用いて各菌種の基準株の配列と比較した。各菌株間を同一菌種と判断するための指標は Kim ら³⁾を参考にし、98.65%以上の相同性を確認した場合に同一菌種と判断した。

マイコプラズマ NK 液体培地(関東化学株式会社)に肺乳剤を接種し増菌後、シカジーニアス牛マイコプラズマハイスクリーニングプラスキット(関東化学株式会社)を用いてマイコプラズマ属 7 菌種 (*Mycoplasma. bovis*、*bovigenitalium*、*californicum*、*bovirhinis*、*canadense*、*alkalescens*、*arginini*) の遺伝子検索を実施した。

(3) 全ゲノム解析

全ゲノム配列を 1020bp のフラグメントに分断し、各 ANI(Average Nucleotide Identity,全ゲノム配列に基づく指標)値を用いて、各 *Mannheimia* 属菌基準株と比較した。さらに、ロイコトキシンをコードする遺伝子 (*lktA*) と類似した配列を有する領域について、他の *Mannheimia* 属菌と比較するため系統樹解析を実施した。

2 ウイルス学的検査

肺を用いて 10%乳剤を作製し、牛 RS ウイルス(BRSV)、牛パラインフルエンザウイルス 3 型(BPI3V)、空腸内容から牛コロナウイルス(BCV)、牛ロタウイルス A,B,C 群(BRV A,B,C)、牛トロウイルス(BToV) 遺伝子検索を実施した。加えて、MDBK-SY 細胞に乳剤を接種し、37°C、5%炭酸ガス下で静置培養した。

3 病理学的検査

剖検後、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、大脳および消化管を 10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施した。加えて、左肺前葉後部、左肺後葉、中葉、副葉について、グラム染色及び、ウサギ抗 *M. varigena* 抗体、ウサギ抗 *Trueperella pyogenes* 抗体、ウサギ抗 *M. haemolytica* 血清型 1 型抗体、ウサギ抗 *Mycoplasma bovis* 抗体、マウス抗 BRSV 抗体を用いて、免疫染色を実施した。

4 病原性解析（本菌培養上清の牛好中球に対する活性酸素産生阻害作用測定）

試験管内における本菌の牛好中球傷害作用を確認するため Saadati らの方法⁵⁾により実施した。本試験は、細菌培養上清と健康な牛の血液から分離された好中球を感作させた後、オプソニン化ザイモザン(以下 OZ)刺激を加えると、その培養上清に好中球の活性酸素産生阻害作用があれば、好中球は失活し、活性酸素を放出しないため、ルミノール試薬を添加しても発光強度は増強されない。そこで、牛好中球に本菌培養上清を感作させ、発光強度を経時的に検出した。培養上清は、本菌をブレインハートインフュージョンブロス(BHI)(ベクトン・ディッキンソン株式会社)37°C、一晚振盪培養後、BHIに再接種し37°C、6時間培養した後、OD₆₀₀で吸光度0.8になるように調整し、遠心後の上清を0.22 μmのフィルターで濾過して調整した。

結果

1 細菌学的検査

(1) 細菌分離および生化学性状試験

肺から本菌及び *T. pyogenes* を分離した。肺以外の主要臓器及び大脳から有意な細菌は分離されず。空腸内容からサルモネラ分離陰性、大腸菌は 4.6×10^5 cfu/g であった。

本菌の生化学性状と *Mannheimia* 属菌を比較した結果、*M. varigena* に一致したが、糖分解試験における、結果は、*M. varigena* と異なっていた(表1)。

表1 *Mannheimia* 属菌と本菌の性状比較

	本菌	<i>M. varigena</i>	<i>M. haemolytica</i>	<i>M. granulomatis</i>	<i>M. glucosida</i>	<i>M. ruminaris</i>
溶血性(羊)	+	+	+	d	+	-
インドール	+	d	-	-	-	-
カタラーゼ活性	+	+	+	+	+	+
オルニチン デカルボキシラーゼ	-	d	-	-	d	-
L-アラビノース	+	+	-	-	d	-
D-ソルビトール	+	-	+	+	+	d
エスクリン	-	-	-	d	+	-

+ : 90%以上陽性 d : 11~89%陽性 - : 90%以上陰性
引用：病性鑑定マニュアル 第4版(農林水産省)

(2) 遺伝子検査

本菌の *Mannheimia* 属同定用 PCR の結果は、*Mannhemia* 属とその近縁種を検出する 16S rRNA 特異遺伝子は検出されたが、同定のための種特異遺伝子は検出されなかった。その結果は、*M. varigena* や *M. granulomatis* と同様であった(表2)。

表 2 *Mannheimia* 属菌同定用 PCR の結果

	本菌	<i>M. varigena</i>	<i>M. haemolytica</i>	<i>M. granulomatis</i>	<i>M. glucosida</i>	<i>M. ruminaris</i>
16S rRNA	+	+	+	+	+	+
Lkt	-	-	+	-	+	-
Lkt2	-	-	-	-	+	-
HP	-	-	+	-	+	+
判定	陰性	陰性	陽性	陰性	陽性	陽性

+ : 特異遺伝子検出 - : 検出限界以下

16S rRNA 遺伝子解析の結果、*M. varigena* との一致率は 97.4% となり既知の *Mannheimia* 属菌の中では最も高い一致率となったが、同定にはいたらなかった(表 3)。

マイコプラズマ属 7 菌種の特異遺伝子は検出されなかった。

表 3 本菌と *Mannheimia* 属菌の 16S rRNA 遺伝子比較

	<i>M. varigena</i>	<i>M. haemolytica</i>	<i>M. granulomatis</i>	<i>M. glucosida</i>	<i>M. ruminaris</i>
16S rRNA 遺伝子 一致率※	97.40%	96.10%	96.70%	-	-

- : データベース上に利用可能なゲノム情報の登録なし。
※同一菌種であれば98.65%以上の一致率を示す³⁾。

(3) 全ゲノム解析

本菌の全ゲノム解析を実施した結果、95.00%以上の ANI 値を示す菌種はなく、本菌は菌種未確定の *Mannheimia* 属菌であることが再確認された。なお、既知の *Mannheimia* 属菌の中では *M. varigena* と最も近縁であった(表 4)。

表 4 各 *Mannheimia* 属菌の基準株と本菌の値の比較

菌種	菌株名	ANI値※
<i>M. varigena</i>	CCUG 38462(T)	88.07%
<i>M. haemolytica</i>	NCTC 9380(T)	82.37%
<i>M. granulomatis</i>	ATCC 49244(T)	81.50%
<i>M. ruminaris</i>	CCUG 38470(T)	-
<i>M. glucosida</i>	CCUG 38457(T)	-

※同一菌種であれば95~96%以上の一致率を示す。

全ゲノム解析より得られた情報により、本菌は *Mannheimia* 属菌に特徴的なロイコトキシン遺伝子(以下 *lktA*)と配列が類似する領域を保有していた。その配列を近縁種と比較した結果、本菌は *M. varigena* の *lktA* 様遺伝子と最も近縁でありその塩基配列の一致率は 97.9% であった。なお、その他の *Mannheimia* 属菌との一致率は 78.8% から 80.8% 程度であった(図 1)。

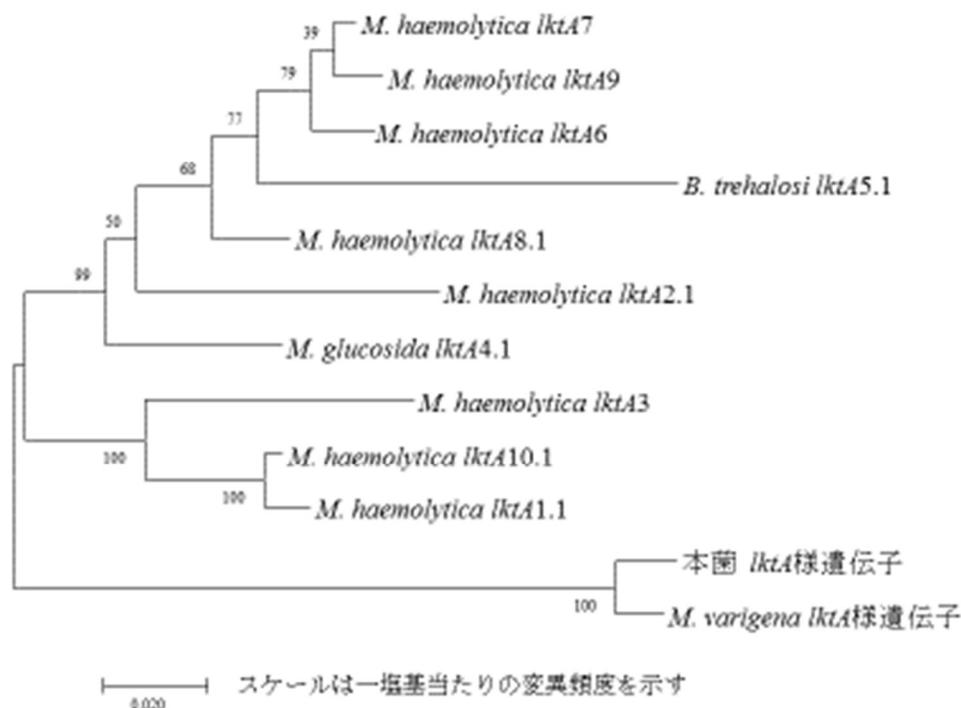


図 1 *Mannheimia* 属菌の *lktA* 及び *lktA* 様遺伝子の塩基配列に基づく系統樹 (近隣結合法)

2 ウイルス学的検査

肺から BRSV 特異遺伝子を検出した。BPI3V、BCV、BRV A,B,C、BToV 特異遺伝子は検出されなかった。また、MDBK-SY 細胞によるウイルス分離は陰性であった。

3 病理学的検査

剖検

右肺前葉前部、左肺後葉、中葉、副葉は肝変化し、隣接する肺葉と線維素性に癒着していた(表 5)。また、縦隔及び肺門リンパ節は腫大していた。消化管は、空腸およびその他の部位の粘膜及びリンパ節に著変は認められなかった。

HE 染色

左肺前葉後部の肺胞内に変性した好中球を認めた(図 2)。左肺後葉では、細気管支内に好中球の浸潤がみられ、周囲の肺胞腔に好中球やマクロファージの浸潤がみられた。中葉、副葉では、凝固壊死巣が認められ、その辺縁に菌塊が認めれ

た。その他の領域では細気管支内腔や周囲の肺胞腔に好中球浸潤がみられた(表 5)。

空腸および回腸のパイエル板のリンパ球は減少し、萎縮していた。

グラム染色

左肺前葉後部の肺胞内にグラム陰性菌塊と好中球が混在して認められた(図 3)。また中葉、副葉にも、凝固壊死巣の辺縁にグラム陰性菌塊が認められた(表 5)。

免疫染色

左肺前葉後部のウサギ抗 *M. varigena* 抗体を用いた免疫染色ではグラム陰性菌塊に一致して陽性反応が認められた(図 4)。

また中葉、副葉にもウサギ抗 *M. varigena* 抗体陽性反応が少数確認された。全ての肺葉で、ウサギ抗 *T. pyogenes* 抗体陽性反応が確認された。

中葉および副葉の凝固壊死巣の辺縁に認められたグラム陰性菌塊は、今回使用した抗体との反応性は検出されなかった。(表 6)

表 5 病理学的検査の結果

部位・検査方法	剖検	HE染色	グラム染色
左肺前葉後部		化膿性気管支肺炎	グラム陰性菌塊
左肺後葉	肝変化・線維素析出		
中葉		化膿性壊死性気管支肺炎	グラム陰性菌塊
副葉			

表 6 各抗血清を用いた免疫組織化学検査の結果

病変が認められた肺葉	<i>M. varigena</i>	<i>M. haemolytica</i> 血清型 1型	<i>T. pyogenes</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>	BRSV
左肺前葉後部	++ (肺胞および細気管支内)	-	++ (肺胞内)	-	-
左肺後葉	-	-	++ (肺胞および細気管支内)	-	-
中葉	+ (肺胞内)	-	++ (肺胞および細気管支内)	-	-
副葉	+ (肺胞内)	-	++ (肺胞および細気管支内)	-	-

+++ : 多数 ++ : 中等度 + : 少数の免疫染色陽性抗原 () 抗原存在部位 - : 陰性

図2 肺胞内の変性した好中球。(矢印)
(矢頭)
(HE染色、bar=10μm)
(=10μm)

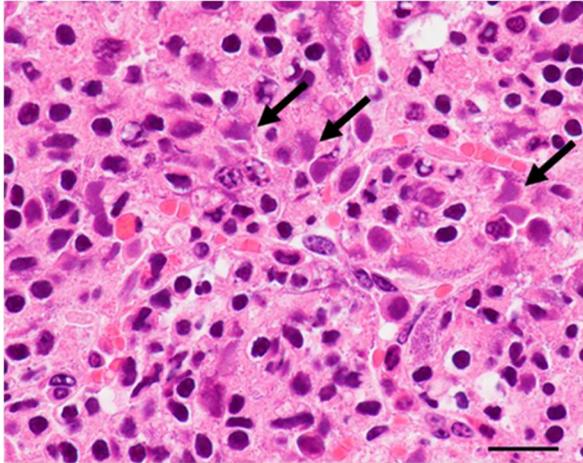


図3 グラム陰性桿菌。
(グラム染色、bar
=10μm)

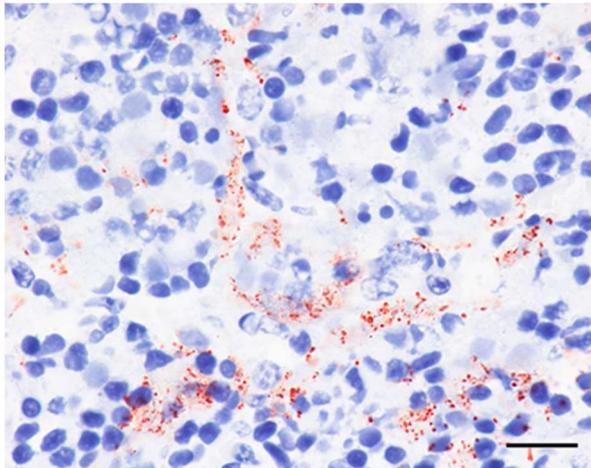
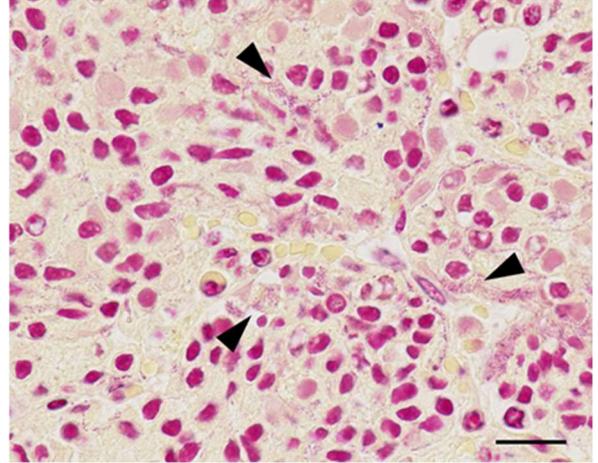


図4 肺胞内のウサギ抗 *M. varigena*
抗体陽性反応。
(免疫染色、bar=10μm)

4 病原性解析

本菌の培養上清原液は、牛好中球の活性酸素産生を完全に阻害した。また、本菌の培養上清は濃度依存的に牛好中球の活性酸素産生を阻害した(図5)。

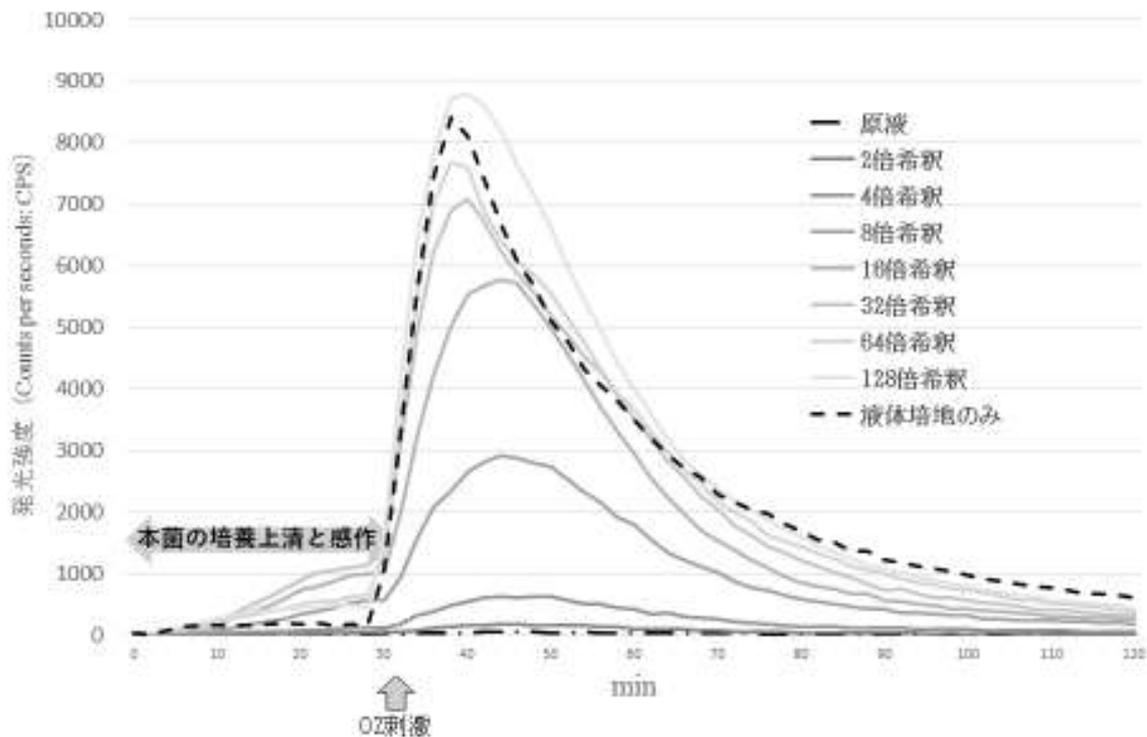


図5 本菌の牛好中球に対する活性酸素産生阻害作用

考察

勝田ら⁴⁾は、国内で分離された *Mannheimia* 属菌 363 株について、16S rRNA 遺伝子解析により菌種再同定を実施した結果、6.6% (24 株) が菌種未確定の *Mannheimia* 属菌であったと報告している。本菌は生化学性状試験の結果から *M. varigena* に近い性状を示すことが分かった。また *Mannheimia* 属菌同定用 PCR の結果は *M. varigena* と同様であった。しかし、菌種同定で広く用いられている

16S rRNA 遺伝子解析での *M. varigena* との一致率は 97.4% を示し、既知の *Mannheimia* 属菌の中では最も近縁であることがわかったが、同一菌種と見なすことのできる基準 (98.65%) を満たしておらず、菌種を確定することはできなかった。

全ゲノム解析および *lktA* 様遺伝子の系統樹解析においても、その塩基配列一致率は *M. varigena* が最も高かった。併せて、免疫染色において左肺前葉後部に確認されたグラム陰性桿菌はウサギ抗 *M. varigena* 抗体に陽性反応を示し、

ウサギ抗 *M. haemolytica* 血清型 1 型抗体には陰性であったことから、本菌の生化学性状、遺伝子、抗原性は *M. varigena* に近いと考える。

本症例の肺からは BRSV、菌種未確定の *Mannheimia* 属菌、*T. pyogenes* が検出された。また、右肺中葉、副葉において今回使用したいずれの抗体とも反応性のないグラム陰性菌塊も確認されている。このことから、複数の病原体が関与した BRDC であったと考える。

本菌の病原性解析より、本菌は牛好中球に対して活性酸素産生阻害作用を有していることがわかった。このことから、左肺前葉後部で認めた好中球変性に本菌が関与した可能性があるかと推察した。

結論、本菌は *M. varigena* と近縁であるが菌種未確定の *Mannheimia* 属菌であり、肺炎病態形成の一部に関与したと推察する。

謝辞

本稿を終えるにあたり、本菌の性状解析についてご助言ご協力を頂いた動物衛生研究部門 動物感染症研究領域 細菌グループの上野 勇一先生、星野尾歌織先生に深謝します。また、病理組織学検査にご助言ご協力を頂きました谷村信彦先生に深謝します。

参考文献

- 1) Alexander, t.w., *et al.* (2008): *Vet. Microbiol.* 130,165-175
- 2) 市川ら(2016) *日獣会誌.* 69,731-736
- 3) Kim, M., *et al.* (2014) *Int. J. Syst. Microbiol.* 64: 346-351
- 4) Ktsuda., *et al.* (2015) *The Journal of Farm Animal in Infection Disease*, 4 巻, 3 号
- 5) Saadati., *et al.* (1997) *J. Med. Microbiol.* 46:276-284

神経指向性アストロウイルスが検出された牛の非化膿性脳炎。

家畜衛生研究所 原田奈美香 瀧澤勝敏 高梨資子 茂木麻奈美
中部家保 平林晴飛

アストロウイルス(Astrovirus : AstV)は主に小児の下痢症の原因の一つとして知られているウイルスで^{11,12)}、牛では下痢の有無を問わず糞便から検出されている^{9,18)}。

2010年以降、これまでにヒト、ミンク、豚、羊及びアルパカでアストロウイルスの関与が疑われる神経性疾患が複数報告されている^{1,3,7,12)}。牛では2013年、アメリカにおいて非化膿性脳炎がみられた牛から初めて bovine astrovirus (BoAstV)の特異遺伝子が検出され⁸⁾、それ以降スイス^{5,14,15,17)}、カナダ^{10,13)}、ウルグアイ⁴⁾、ドイツ⁶⁾、韓国¹⁶⁾において脳炎が認められた中枢神経系から遺伝子の検出報告が相次いでなされている。国内では2018年に初めて鹿児島県で神経症状を呈した黒毛和種の大脳から BoAstV (kagohimaSR28-462_brain) が検出された¹⁸⁾。今回、非化膿性脳炎がみられた牛の大脳から BoAstV の特異遺伝子が検出され、BoAstV の関与が疑われた国内で2例目となる症例と遭遇したため、その概要を報告する。

発生概要

搾乳牛約200頭、育成牛約30頭、子牛約20頭を飼養する酪農場において、2017年12月生まれの搾乳牛(ホルスタイン種)1頭が2021年1月28日朝、フリーストール舎内で横臥し、食欲不振、夕方には起立し搾乳パーラーまで移動するが、泌乳量は減少していた。翌日、横臥し、元気消失、食欲不振のため予後不良と診断され安楽殺し、同日、当所において病性鑑定を実施した。当該牛に治療歴はなかった。当該農場では同年1月27日に同様の症状を呈した搾乳牛が1頭死亡していた。

材料及び方法

1 血液学的検査

全血を用いて白血球、ヘモグロビン、赤血球、Ht、赤血球容積、血小板および白血球百分比を測定した。

2 生化学的検査

血清を用いてBUN、グルコース、総コレステロール、GOT、 γ -GTP、T-Bil、クレアチニン、CPK、Ca、Mg、IP、TP、Albを測定した。

3 細菌学的検査

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺及び大脳について5%羊血液加寒天培地を用いて

5%炭酸ガス培養、DHL寒天培地を用いて好気培養を実施した。

4 ウイルス学的検査

遺伝子検査では大脳を用いてアルボウイルス（アカバネウイルス、アイノウイルス、ピートンウイルス、サシユペリウイルス、シャモンダウイルス、イバラキ病ウイルス、チュウザンウイルス、ディアギュラウイルス、ブルータングウイルス）、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、悪性カタル熱ウイルス、羊関連悪性カタル熱ウイルス、ボルナ病ウイルス及びAstVのPCRを実施した。AstVについてはRNAを抽出し、RT-PCR法でAstVの非構造蛋白質領域（*pol*）を増幅後、塩基配列を決定し、NJ法にて分子系統樹解析を行った。

抗体検査では、血清を用いてウエスタンブロット法でボルナ病ウイルスについて検査を実施した。

5 病理学的検査

剖検後、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、消化管及び中枢神経系を10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施した。

結果

1 血液学的検査結果

表1(a)に結果を示した。百分比において、好中球の左方移動が認められた。

2 生化学的検査結果

表1(b)に結果を示した。グルコース、総コレステロール、GOT、 γ -GTP、CPK、IP、Albの高値、Ca、TPの低値が認められた。

3 解剖所見

外貌は軽度瘦削していた。大脳髄膜の混濁、肝臓の退色を伴う腫大、腎臓の腫大、皮下および筋間結合組織の軽度な水腫がみられた他、空腸中部粘膜の暗赤色化及び赤褐色水様物の貯留が認められたが、総じて特徴的な所見には乏しかった。

4 細菌学的検査結果

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺及び大脳から有意な細菌は分離されなかった。空腸上部内容から分離された大腸菌および*Clostridium perfringens*は 1.0×10^4 cfu/g未満であった。

5 ウイルス学的検査結果

大脳からAstVの特異遺伝子が検出された。分子系統樹解析を実施したところ、検出された遺伝子断片(Gu211102)は、国内唯一の鹿児島県における症例(KagoshimaSR28-462)の*pol*領域と95%(405/425塩基)一致した。海外の症例CH13/NeuroS1とも90%以上の相同性を示した。その他、大脳からアルボウイル

ス、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、悪性カタル熱ウイルス、羊関連悪性カタル熱ウイルス、ボルナ病ウイルスの特異遺伝子は検出されなかった。血清を用いたボルナ病ウイルスの抗体検査は陰性であった。

6 病理検査結果

中枢神経系では、大脳、間脳、中脳および延髄にリンパ球や形質細胞からなる囲管性細胞浸潤（図 2）やグリア細胞の集簇（図 3）が認められた。囲管性細胞浸潤は特に間脳、中脳、橋、延髄で細胞層が 5～11 層と厚く、より重度であった。大脳、中脳、小脳、橋および延髄の髄膜の血管周囲にリンパ球の浸潤が認められ、大脳、橋および延髄で軽度、中脳および小脳で中等度であった（図 4）。病変の分布を表 2 に示した。三叉神経節では神経線維間にリンパ球の集簇が認められた（図 5）。その他の臓器では、肝臓の肝細胞の細胞質内に空胞がみられ、脾臓では赤脾髄にヘモジデリン貪食マクロファージの浸潤がみられた。空腸の絨毛はうっ血し、空腸および回腸のパイエル板のリンパ球は減少していた。

考察

本症例は病理組織検査において非化膿性脳炎を認めたことから、食欲不振および泌乳量の低下、起立不能の原因としてウイルス性疾患が疑われた。ウイルス性脳炎の原因としては、アルボウイルス、牛伝染性鼻気管炎ウイルス、日本脳炎ウイルス、悪性カタル熱ウイルス、羊関連悪性カタル熱ウイルス、ボルナ病ウイルスおよび BoAstV が類症鑑別に挙げられた。遺伝子検査の結果、大脳から BoAstV の特異遺伝子が検出され、他のウイルスはいずれも検出されなかった。その他、病理組織所見から狂犬病ウイルス、BSE は否定された。細菌検査では有意な病原細菌は分離されなかった。当該牛は治療歴がなく、抗生剤は投与していない。また病理組織検査において菌体は認められず、更に血液検査において白血球数の上昇は認められなかった。これらのことから、連鎖球菌 (*Streptococcus ruminantium*、*Streptococcus gallolyticus*、*Streptococcus suis*) や *Listeria monocytogenes* 等の細菌感染は否定された。以上より、本症例の脳炎に BoAstV の関与が疑われた。神経指向性 BoAstV はこれまでに中枢神経系における PCR の他、組織切片上で *in situ* ハイブリダイゼーション^{4,5,6,8,15,16}や免疫組織化学的検査^{2,4,13,15}によりその存在が多数確認されているが、分離された事例がなく⁽¹²⁾、その病原性は確認されていない。そのため本症例の脳炎への BoAstV の関与が疑われたが、確定診断には至らなかった。

過去の神経指向性 BoAstV が検出された脳炎の病変分布は、ほとんどの症例で脳幹でより炎症が重度であるという傾向がある^{4,5,6,8,10,16,17,18}が、本症例はこれに加えて大脳、髄膜、更に三叉神経節においても非化膿性の炎症が認められ、炎症の分布が広範囲に及んでいた。また、本症例で、より重度な脳炎が認められた脳幹においては、囲管性細胞浸潤の細胞層が 5～11 層と厚いことが特徴的であっ

た。Maria T Spinato らが報告した症例でも 3~8 層と層の厚い囲管性細胞浸潤が認められている⁽¹⁰⁾。病変の分布や炎症の程度は感染が成立してからの時間経過や感染牛の免疫力、その他の重感染の有無やストレスが要因として考えられた。空腸および回腸のパイエル板にリンパ球の減少が認められたため、免疫機能が低下していた可能性が考えられたが、脳炎の発症との関連は不明であった。

AstV は哺乳類の *Mamastrovirus* と鳥類の *Aviastrovirus* に大別され、*Mamastrovirus* は現在 33 の遺伝子型が存在する。これまで牛において報告されてきた神経指向性 AstV (NeuroS1、CH13、BH89 等) は *Mamastrovirus* 13 に分類され、腸管病原性の AstV とは区別されてきた。本症例の脳から検出された AstV の遺伝子断片 (Gu211102) は過去の神経指向性 AstV と同様に *Mamastrovirus* 13 に近縁の kagoshimaSR28-462 と最も高い相同性を示し、本症例も腸管病原性の AstV とは区別された。

2013 年、アメリカで初めて BoAstV (NeuroS1) が検出された後に実施された回顧的調査では、原因不明であった脳炎の 9% から BoAstV の特異遺伝子が検出されたと報告している。この調査はホルマリン固定された脳の一部もしくはパラフィンブロックを用いた検査であったため、過小評価であると考えられている⁸⁾。また、スイスでは、2014 年と 2017 年にそれぞれ原因究明に至らなかった脳炎の 25%⁵⁾ と 34%¹⁵⁾ で BoAstV の特異遺伝子が検出されたと報告されており、神経指向性 BoAstV はすでに広く浸潤している可能性が示唆された。これらのことから、BoAstV の関与が疑われる脳炎は 2013 年にアメリカで初めて発見されて以降、ヨーロッパやアジアで相次いで遺伝子検出報告がなされているが、2013 年に新しく出現したウイルスではなく、以前からあったということは明白である。また、Federico giannitti らの系統学的解析によると、神経指向性 BoAstV は主に CH13 と NeuroS1 の 2 つの系統に分けられるが、これらの共通の祖先はおよそ 1885 年にヨーロッパで生じ、1900 年代の初めに、2 つの系統に別れ、CH13 系統はヨーロッパで循環し続け、NeuroS1 系統はアメリカとアジアに広がったことがわかった。その後、北米に広がり、後に日本に侵入したと考えられている⁴⁾。本症例は国内で 2018 年の鹿児島県の症例 (KagoshimaSR28-462) と *pol* 領域が 95% 一致した。当該農場の育成牛は鹿児島県以外の都道府県の 1 農場に飼養を預託しており、当該牛も 1 歳齢の時に同農場へ預託歴がある他、当該農場の後継牛はすべて自家産であり、導入歴がないことから、鹿児島内の農場と当該農場に疫学的な直接の関連はない。このことから、詳細は不明ながら、国内においても神経指向性 BoAstV が広く浸潤している可能性、もしくは浸潤しつつある可能性が考えられた。

神経指向性 BoAstV の関与が示唆される脳炎はアメリカやヨーロッパ、アジアで多数の遺伝子検出報告があるが、ウイルスの分離および培養が困難であるため、

不明な点が多い¹²⁾。BoAstV と非化膿性脳炎の関連を明らかにするために、今後、原因不明の非化膿性脳炎と遭遇した際は、BoAstV も視野に入れ検索し、症例を積み重ねていく必要がある。

謝辞

稿を終えるにあたり悪性カタル熱ウイルス、羊関連悪性カタル熱ウイルスおよびBoAstV の遺伝子検査、ご助言を頂いた動物衛生研究部門ウイルス疫学研究領域牛ウイルスユニット松浦 裕一先生、ボルナ病ウイルスの抗体検査、遺伝子検査およびご助言を頂いた酪農学園大学獣医学群・獣医学類萩原克郎先生に深謝する。

表 1 (a)血液学的検査結果。(b)生化学的検査結果。高値：↑、低値：↓で示す。(基準値は獣医内科学大動物編、文永堂出版、2014 年を参考にした。)

(a)

検査項目		測定値	
WBC	(μL)	4500	
Hb	(g/dL)	12.0	
RBC	($\times 10^4 \mu\text{L}$)	729	
Ht	(%)	32.1	
MCV	(fl)	44.0	
PLT	($\times 10^4 \mu\text{L}$)	59.7	
白血球 百分比 (%)	好中球	桿状	25
		2分葉	22
		3分葉	7
		4分葉	3
		5分葉	0
	リンパ球		42
	単球		1
	好酸球		0
	好塩基球		0

(b)

検査項目		測定値
BUN	(mg/dL)	15.2
グルコース	(mg/dL)	92 ↑
総コレステロール	(mg/dL)	186 ↑
GOT	(U/L)	346 ↑
γ -GTP	(U/L)	42 ↑
T-Bil	(mg/dL)	0.4
クレアチニン	(mg/dL)	0.50
CPK	(IU/L)	>2000 ↑
Ca	(mg/dL)	8.1 ↓
Mg	(mg/dL)	2.3
IP	(mg/dL)	7.1 ↑
TP	(g/dL)	6.6 ↓
Alb	(g/dL)	4.0 ↑

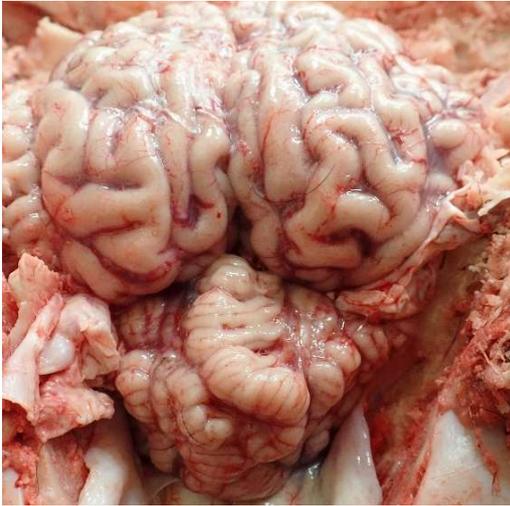


図1 大脳髄膜が混濁していた。

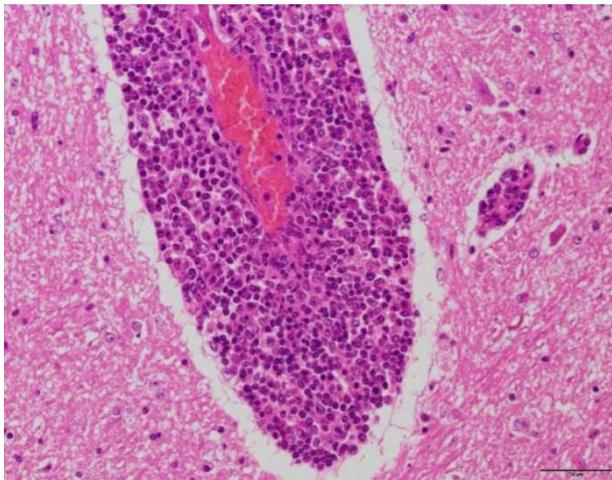


図2 中脳。細胞層の厚い囲管性細胞浸潤がみられた。

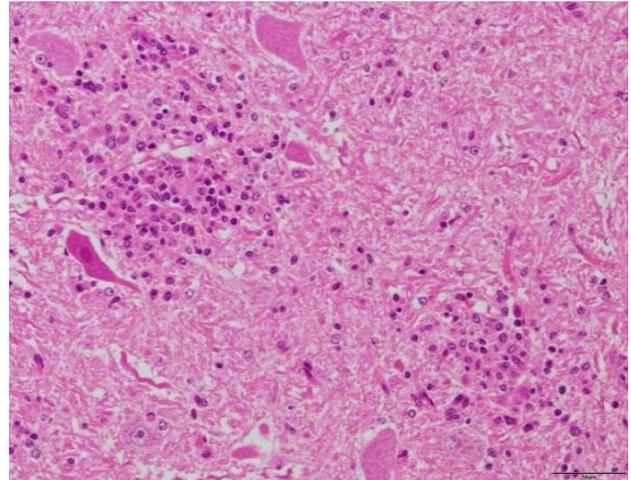


図3 中脳。グリア細胞の集簇が多発していた。

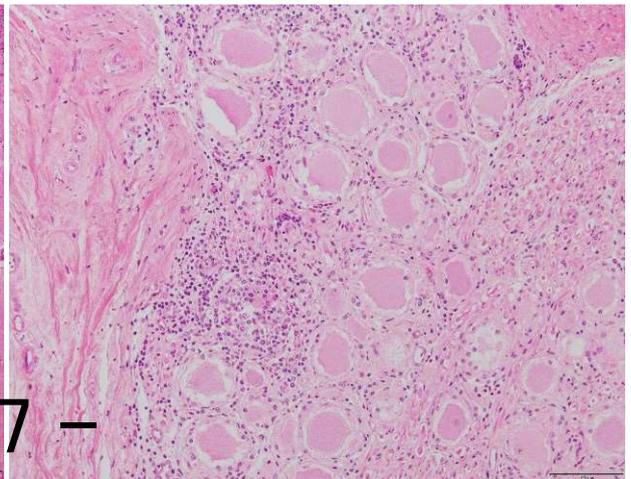
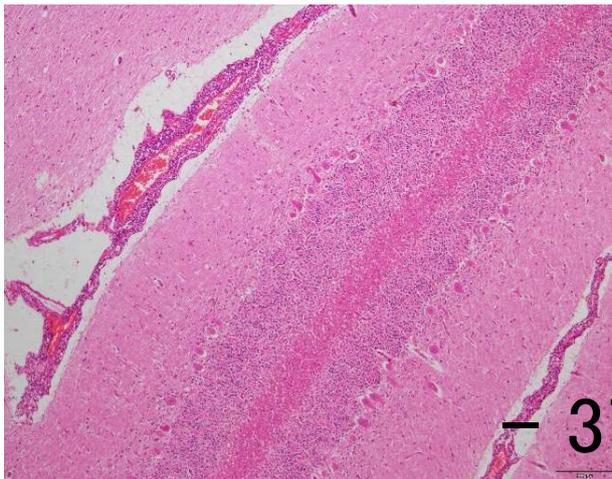


図4 小脳。髄膜の血管周囲にリンパ球の集簇がみられた。 図5 三叉神経節。神経線維間にリンパ球の集簇がみられた。

表2 中枢神経系における囲管性細胞浸潤、グリア集簇、髄膜炎の分布。

－:炎症なし、±:軽微、+:軽度、++:中等度、+++:重度

		囲管性細胞浸潤	グリア集簇	髄膜炎
大脳	前頭葉	+	+	±
	線条体	++	+	+
	頭頂葉	－	+	－
	側頭葉	++	++	－
間脳		+++	+++	
中脳		+++	+++	++
橋		+++	++	－
延髄		+++	++	+
小脳		－	±	++

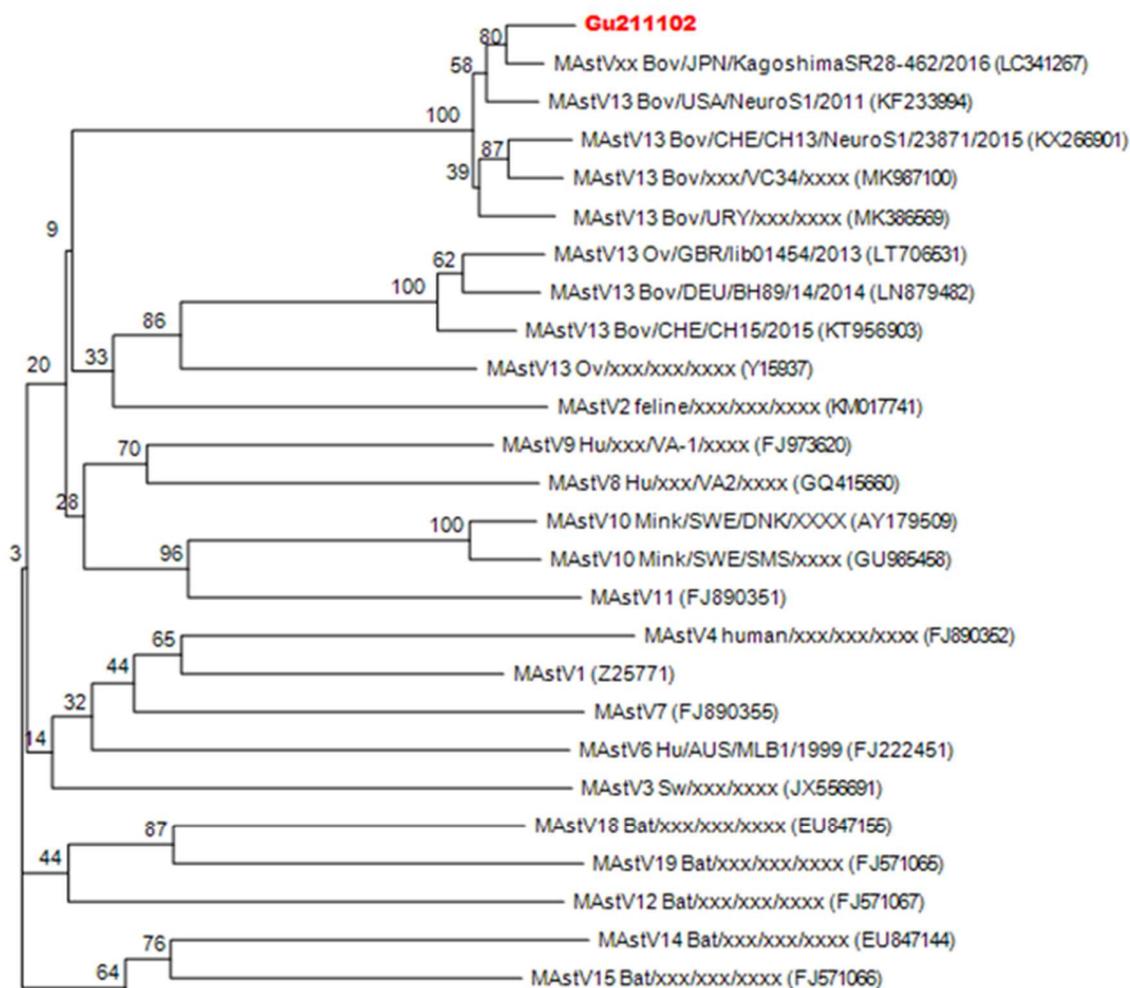


図7 分子系統樹解析結果。本症例の検出遺伝子 (Gu211102) は kagosgimaSR28-462 に近縁。(NJ 法、kimura's 2 パラメーター、ブートストラ

引用文献

- (1) Anne-Lie Blomström *et al.*, Astrovirus as a possible cause of congenital tremor type AII in piglets? , *Acta Veterinaria Scandinavica*, 16;56(1):82, **2014**
- (2) Céline L. Boujona *et al.*, Development and validation of an immunohistochemistry procedure for the detection of a neurotropic bovine astrovirus., *Journal of Virological Methods*, 239, 26–33, **2017**
- (3) Céline L. Boujon *et al.*, Indication of Cross-Species Transmission of Astrovirus Associated with Encephalitis in Sheep and Cattle., *Emerging Infectious Diseases*, 23, 9, **2017**
- (4) Federico Giannitti *et al.*, The First Case of Bovine Astrovirus-Associated Encephalitis in the Southern Hemisphere (Uruguay), Uncovers Evidence of Viral Introduction to the Americas From Europe ., *Frontiers in Microbiology*, Vol. 10, 1240, **2019**
- (5) Ilias G. Bouzalas *et al.*, Neurotropic Astrovirus in Cattle with Nonsuppurative Encephalitis in Europe. , *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 52, 9, **2014**
- (6) Kore Schlottau *et al.*, Detection of a Novel Bovine Astrovirus in a Cow with Encephalitis., *Transboundary and Emerging Diseases* , Vol.63, 3, **2016**
- (7) Leonore Kuchler *et al.*, Astrovirus-Associated Polioencephalomyelitis in an Alpaca, *Viruses*, 13, 50, **2021**
- (8) Linlin Li *et al.*, Divergent Astrovirus Associated with Neurologic Disease in Cattle Emerging Infectious Diseases., *Emerging Infection Diseases*, Vol. 19, 9, **2013**
- (9) Makoto Nagai *et al.*, Full genome analysis of bovine astrovirus from fecal samples of cattle in Japan: identification of possible interspecies transmission of bovine astrovirus., *Archives of Virology*, 160, 2491–2501, **2015**
- (10) Maria T Spinato *et al.*, Identification of bovine astrovirus in cases of bovine non-suppurative encephalitis in eastern Canada., *Canadian Veterinary Journal*, 58(6), 607-609, **2017**
- (11) Nicholas Wohlgenuth *et al.*, Astrovirus evolution and emergence., *Infection, Genetics and Evolution*, 69, 30–37, **2019**
- (12) Nicole Wildi *et al.*, Neurotropic Astroviruses in Animals., *Viruses*, 13, 1201, **2021**
- (13) Senija Selimovic-Hamza *et al.*, Bovine astrovirus infection in feedlot cattle with neurological disease in western Canada., *Canadian Veterinary Journal* , 58, 601–603, **2017**
- (14) Senija Selimovic-Hamza *et al.*, Detection of Astrovirus in Historical Cases of European Sporadic Bovine Encephalitis, Switzerland 1958–1976., *Frontiers in Veterinary Science*, 11;3, 91, **2016**
- (15) Senija Selimovic-Hamza *et al.*, Frequency and Pathological Phenotype of Bovine

Astrovirus CH13/NeuroS1 Infection in Neurologically-Diseased Cattle: Towards Assessment of Causality., *Viruses*, 10, 3390, **2017**

(16) Sook-Young Lee *et al.*, Astrovirus Infection in Cattle with Nonsuppurative Meningoencephalitis in South Korea., *Viruses*, 13, 1941, **2021**

(17) Torsten Seuberlich *et al.*, Identification of a second encephalitis-associated astrovirus in cattle., *Emerging Microbes and Infections*, Vol. 5, e5, **2016**

(18) Yoshimasa Hirashima *et al.*, Whole genome analysis of a novel neurotropic bovine astrovirus detected in a Japanese black steer with non-suppurative encephalomyelitis in Japan., *Archives of Virology*, 163, 2805–2810, **2018**