放牧牛に発生した輸送熱とそれに関与した病原体

小茂田匡央^{*1)} 小材幸雄^{*2)} 糸井 浩^{*1)} 野呂明弘^{*1)} 山田 勤^{*1)}

木村容子^{*1)} 野口 求^{*1)} 小泉俊二^{*1)}

(昭和 63 年 4 月 15 日受理)

An Occurrence of Shipping Fever Associated with Several Pathogens in Grazing Calves

MASAO KOMODA (Institute of Animal Health, Prefecture of Gunma, Fujimi Mura, Gunma 371-01) YUKIO KOZAI, HIROSHI ITOI, AKIHIRO NORO, TSUTOMU YAMADA, YUKO KIMURA, MOTOMU NOGUCHI and SHUNJI KOIZUMI

SUMMARY

Respiratory disease characterized by pyrexia, depression, nasal discharge and cough occurred in some of 254 grazing Holstein calves 1 week after their introduction into a pasture and one of them subsequently died.

Mycoplasma bovirhinis, *Pasteurella multocida*, *Pasteurella haemolytica* and Parainfluenza virus type 3 were isolated from these cattle. The results of serological tests on the paired sera of these cattle showed a significant rise in antibody titers against not only these isolated organisms but also to bovine viral diarrhoea-mucosal disease virus. Autopsy revealed focal pneumonia and whitish pseudomembrane in the paranasal sinuses of the cow that died. Histologically, acidophilic cytoplasmic inclusion bodies were observed in the epithelial cells of the paranasal sinuses.

From these results, this disease was diagnosed as shipping fever caused by mixed infection with Parainfluenza virus type 3 and other pathogens.

要 約

1986 年 5 月、県内の一放牧場に入牧した 254 頭の乳用育成牛群に入牧後 1 週間ほどで元気消失、発熱、鼻汁漏出、発咳等を主徴とする呼吸器病が発生した。発症牛 6 頭の鼻腔ぬぐい液を検査したところ、5 例から *Mycoplasma* (M) *bovirhinis* と *Pasteurella* (P) *multocida*、3 例から *P. haemolytica* が分離され、2 例から Parainfluenza virus type 3 (PI-3) が分離された。また、斃死例の肺と副鼻腔から *P. haemolytica* と *M. bovirhinis* が分離された。

発症牛 6 頭のペア血清について抗体検査を実施したところ、*M. bovirhinis*、PI-3 および牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルス (BVD・MDV) に対する抗体価の上昇が認められた。

斃死した 1 頭を剖検したところ、限局性の肺炎巣が認められ、気管および気管支内には線維素を混じた泡沫液を入れ、副鼻腔の粘膜は赤色で、白色偽膜様物を附着し、乳白色粘稠液を充満していた。病理組織学的には、肺のうっ血と水腫が著明で、細気管支と副鼻腔の粘膜上皮内に好酸性の細胞質内封入体がみられた。

以上の成績から、本症例は PI-3 感染に *M. bovirhinis*、*P. haemolytica* および *P. multocida* 感染が複合的に関与して発生したものと考えられた。BVD・MDV の本症への関与は明確ではなかった。

放牧牛で多発する疾病としては、ピロプラズマ病、呼吸器病、下痢症、蹄病などがあるが、これらは、さまざまな罹病歴をもつ多くの牛が 1 箇所に集合することによって、相互に病原体の新たな伝播が起こるために惹きさ

れるもので、病勢が複雑化する例が多い。放牧初期にこれらの疾病に罹患すると発育の停滞をきたし、その後の放牧成績に与える影響もきわめて大きい。

今回、群馬県内の一育成牧場で入牧後 1 週間から 3 週間にかけて発生した呼吸器病の流行例に遭遇したので、その発生の概要について報告する。

^{*1)} 群馬県家畜衛生研究所 (勢多郡富士見村大字小暮 2416)

^{*2)} 群馬県利根家畜保健衛生所 (沼田市薄根町 3236-2)

1. 材料および方法

1) 検 体

1986年5月22日に、育成牧場に導入されて間もなく呼吸器症状を呈した254頭の牛群のうち、発症初期と思われる牛6頭の鼻腔ぬぐい液と血液(6月6日採材)、および6月9日に死亡した牛の主要臓器を検査材料とした。

2) 細菌学的検査

鼻腔ぬぐい液と死亡牛の各実質臓器を5%綿羊血液加寒天培地で好気培養、炭酸ガス培養および嫌気培養を行い、分離菌は常法に従い生物学的性状検査により同定した⁹⁾。また、マイコプラズマおよびウレアプラズマ検索のため、CHANOCKらの培地、ブドウ糖-血清培地およびTAYLOR-ROBINSON培地を用いて定量培養を行った⁵⁾。分離したマイコプラズマはクローニング後、酵素抗体濾紙法により同定した²⁾。

3) ウイルス学的検査

鼻腔ぬぐい液をイーグル液(イーグルMEMにトリプトスフォスフェイトブROSを10%加えたものにゲンタマイシン100μg/ml、ファンギゾーン25γ/mlを添加)で10%浮遊液とした後、遠心せず初代牛胎児腎および精巢細胞に接種し、37℃1時間吸着させた後、36℃で回転培養を行い、3代目まで継代した。細胞変性効果(CPE)の出現したものについては、常法に従い生物学的性状を調べる⁹⁾とともに、パラインフルエンザウイルス3型(PI-3)に対する抗血清を用い、赤血球凝集抑制(HI)試験を行いウイルスを同定した。

4) 血清抗体検査

発症牛6頭のベア血清(前血清:6月6日、後血清:7月3日採取)について、PI-3、牛アデノウイルス7型(Ad-7)については、それぞれBN-1株、袋井株を用いてHI試験を行い、牛RSウイルス(RSV)、牛ヘルペスウイルス1型(BH-1)および牛ウイルス性下痢・粘膜病ウイルス(BVD・MDV)については、それぞれNMK7株、756株、および十勝株を用いて中和試験を行った。なお、

PI-3については分離株を用いて中和試験も行った。

また、マイコプラズマについては代謝阻止試験、パステレラについてはマイクロプレート凝集反応によって抗価を測定した。

5) 病理組織学的検査

斃死牛について、剖検後、常法により主要臓器のパラフィン包埋切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行い、病理組織学的検査を行った。

2. 成 績

1) 発 生 状 況

流行の見られた県西部の、ホルスタイン種を放牧するK育成牧場には1986年5月8日に226頭、5月22日に254頭が入牧した。5月22日に入牧した牛群で、6日後から元気を消失した牛が散見され、10日後の6月1日には、元気・食欲の消失とともに、発熱、呼吸速迫、発咳、流涎、漿液性あるいは粘性の鼻汁漏出などの呼吸器症状を強く示す牛が急激に増加した。翌6月2日にはそれが群全体に波及したため、抗生物質の全頭投与を実施するとともに、症状の重篤なものについては隔離して対症療法を行った。6月9日には重篤な症状のために隔離されていた1頭が斃死した。その後、治療頭数は急速に減少しはじめ、6月22日には発生が終息した。

2) 細菌学的検査成績

細菌およびマイコプラズマの分離成績を表1に示した。5頭の鼻腔ぬぐい液から *Mycoplasma bovirhinis* $10^2 \sim 10^{10}$ CCU/ml と *Pasteurella multocida* が、3頭から *P. haemolytica*、さらに1頭から *Staphylococcus* が分離した。

また、斃死牛の肺と副鼻腔からそれぞれ 10^2 , 10^3 CFU/g の *P. haemolytica*, 10^{10} CCU/ml の *M. bovirhinis* が分離された。

3) ウイルス学的検査成績

表1に示したとおり、牛胎児腎細胞および牛精巢細胞に接種した2頭(No. 279, 435)の鼻腔ぬぐい液から継代2代目および3代目で明瞭なCPEを示すウイルスが

表1 罹患牛からの細菌、マイコプラズマおよびウイルス分離

牛 No.	検査材料	分離病原体(分離菌量)					備考
		<i>M. bovirhinis</i>	<i>P. multocida</i>	<i>P. haemolytica</i>	<i>Staphylococcus</i>	PI-3	
262	肺	○(10^{10})*		○(102)**			斃死牛
	副鼻腔	○(10^{10})		○(103)			
279	鼻 汁	○($10^{10<}$)	○	○		○	発症牛
334	"	○(10^2)	○				"
343	"	○(10^5)	○	○			"
407	"	○($10^{10<}$)	○				"
435	"				○	○	"
471	"	○($10^{10<}$)	○	○			"

注) *: CCU/ml **: CFU/ml

表2 罹患牛のベア血清における各種ウイルスに対する抗体価の推移

牛 No.	PI-3(分離株)		PI-3*		BVD・MDV		RS		IBR		Ad-7*	
	発症期	回復期	発症期	回復期	発症期	回復期	発症期	回復期	発症期	回復期	発症期	回復期
279	2	128	<10	40	8	512	<2	<2	<2	<2	<10	<10
334	256	64	10	<10	<2	128	<2	<2	<2	<2	<10	<10
343	2	256	<10	40	<2	128	<2	4	<2	4	<10	<10
407	<2	1024	<10	160	<2	256	2	<2	2	<2	<10	<10
435	2	256	<10	80	<2	64	<2	<2	<2	<2	<10	<10
471	64	512	<10	80	<2	16	2	<2	2	<2	<10	<10

注) *: HI 試験による その他は中和試験による。

表3 罹患牛のベア血清におけるマイコプラズマと *P. haemolytica* に対する抗体価の推移

牛 No.	<i>M. bovirhinis</i>		<i>M. bovis</i>		<i>M. bovis genitalium</i>		<i>P. haemolytica</i>	
	発症期	回復期	発症期	回復期	発症期	回復期	発症期	回復期
279	<2	64	4	2	<2	<2	8	16
334	<2	128	<2	<2	<2	<2	16	16
343	<2	16	4	64	<2	<2	16	16
407	<2	32	<2	<2	<2	<2	16	16
435	<2	16	<2	<2	<2	<2	8	16
471	16	128	2	2	<2	<2	8	16

分離された。

分離ウイルスは牛赤血球を凝集し、50 nm のフィルターを通過せず、クロロホルムで不活化された。また、PI-3 (BN-1 株) に対する抗血清で牛赤血球凝集性が完全に抑制されたことから、本ウイルスは PI-3 と同定され、GB 8611 株と命名された。

4) 血清抗体検査成績

6 頭の牛の発症期と回復期の血清について行った、ウイルス、マイコプラズマ、およびパスツレラに対する抗体価測定の成績を表2、および表3に示した。

PI-3 に対する中和抗体および HI 抗体は、334 号牛を除いた他の5頭の回復期血清においてそれぞれ3~10管および3~5管の上昇がみられた。また、BVD・MD に対する中和抗体価も上昇していた。しかし、RS, BH-1, Ad-7 に対する抗体の有意な変動は認められなかった。

M. bovirhinis に対する抗体価は、発症期では 471 号牛

を除いて2倍以下であったが、回復期では全頭とも16倍から128倍と上昇がみられた。その他のマイコプラズマに対する抗体価には、有意な上昇はみられなかった。

5) 斃死牛の病理学的検査成績

斃死牛は11カ月齢のホルスタイン種の雌で、外見的には削瘦し、脱水状態であった。剖検したところ、肺では右前葉から中葉の辺縁部および左葉の中葉と後葉の接する部位に限局して肺炎巣がみられた。気管および気管支内には、淡褐色の線維素様物を混じた白色泡沫液が充満していた。また、壁側胸膜に、赤色線維素の析出がみられた。副鼻腔内には淡乳白色の粘液が充満し、粘膜面に偽膜様絮状物が付着し、一部出血がみられた。頭頸部のリンパ節はやや水腫性に腫張し、剖面は赤色を呈していた。その他の臓器には著変は認められなかった。

組織所見では、肺のうっ血と水腫が強く、肺胞内や気

写真1 副鼻腔：副鼻腔内に淡乳白色の粘液が充満

写真2 細気管支の粘膜上皮内に観察された好酸性の細胞質内封入体 (HE 染色 ×400)

管支内に漿液を含むほか、マクロファージ、好中球、細胞体がみられた。小葉間質、細気管支は水腫性であった。また、肺門リンパ節ではうっ血と血液吸収がみられた。細気管支および副鼻腔の粘膜上皮内に好酸性の細胞質内封入体がみられた。気管支上皮は剝離し、マクロファージ等の退廃物もみられ、固有層では円形細胞の浸潤がみられた。

3. 考 察

遠隔地からの輸送に伴う環境の急変、および寒冷感作などの種々なストレスによって惹起される輸送熱では、ウイルス、マイコプラズマ、あるいは細菌などの複合感染が誘発され、病勢の増悪を招くことが広く知られている^{1,4,7,9-15)}。

今回検索した呼吸器病では、発症牛の鼻汁ならびに斃死牛の肺から *P. multocida*, *P. haemolytica*, *M. bovirhinis* および PI-3 が分離された。これら微生物の病原性については、稲葉ら⁹⁾は PI-3・BN-1 株を牛の鼻腔内、気管支内に接種することによって臨床的および病理学的に肺炎を再現できたことを報告している。また、GOURLAY ら¹⁾はマイコプラズマの接種によって実験的に肺炎を惹起し得たことを報告している。しかし、通常的环境下ではこれらの微生物は単独で感染させた場合には、牛に対して肺炎を起こさせることはほとんどなく、いわゆる通性感染微生物と考えられている^{11,12)}。したがって、分離された細菌、マイコプラズマなどのうち、どれが疾病の発生に第一義的に関与したかを特定することはかなりむずかしい問題となる。成績には示さなかったが、分離された PI-3 および *M. bovirhinis* を用いて行った感染実験でも、実験牛は両病原体接種後、軽度の鼻汁漏出を示した以外には臨床的に症状は示さなかった。

ペア血清を用いて行った、牛の呼吸器病の原因として検出される頻度の高い5種のウイルス、3種のマイコプラズマおよび *P. haemolytica* に対する抗体検査においては PI-3, BVD・MD および *M. bovirhinis* に対する抗体価の上昇が認められた。この成績は、これら3種の病原体が本症の発生に関与したことを強く示唆するものと考えられる。

いっぽう、本症に関する病理組織学的検査の報告をみると、SCHIEFER ら¹⁰⁾は *P. haemolytica* は線維素性胸膜肺炎の発現に、*P. multocida* は線維素性気管支肺炎の発現に強く係わるだろうと報告している。今回観察された線維素性胸膜肺炎、あるいは、組織学的に認められた肺における炎症性細胞浸潤などは、本症に *P. haemolytica* および

P. multocida の両者が関与していたであろうことを示唆している。

これらの諸事実から、本症の発生には5種あるいはそれ以上の病原体が関与していたと思われるが、中でも、臨床症状、微生物学的および血清学的検査成績から、PI-3 は本症の主因となったものと考えられた。各々の牛の病勢には放牧前の衛生状態が強く反映していたと思われる。また、本症が急速に全群に伝播したことは、発生が放牧初期であったために、夜間には254頭を1畜舎内に収容するといった過密な飼養形態に原因があったと推察される。本症の発生予防にあたっては、その発生には多くの病原体が複合的に関与し得ることを十分に認識し、移動および入牧直後のストレス軽減のための放牧予定牛の馴致の徹底、入牧時の個体検査、さらに、入牧後の看視を徹底することなど、早期に対応できる体勢をつくることが重要であろう。

引用文献

- 1) GOURLAY, R. N., HOWARD, C. J. and THOMAS, L. H., et al.: *Res. Vet. Sci.*, 27, 233~237 (1979).
- 2) 今田由美子, 小茂田匡央, 吉田佳充, ほか第99回日本獣医学会講演要旨集, 176 (1985).
- 3) INABA, Y., et al.: *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)* 4, 145~150 (1964).
- 4) 内藤慎吾, 藤田 耕, 鵜飼重明, ほか: 臨床獣医, 4, 6, 80~86 (1986).
- 5) 中村昌弘: ヒト・動物および植物マイコプラズマの分離と同定, 菜根出版, 東京 (1982).
- 6) 大谷 明: ウイルス実験学総論, 国立予防衛生研究所学友会編, 丸善, 東京 (1981).
- 7) 大森常良: 牛病学, 大森常良, 安藤敬太郎, 石谷類造ら編, 第1版, 336~342, 近代出版, 東京 (1974).
- 8) 坂崎利一訳: 医学細菌同定の手びき, 近代出版, 東京 (1974).
- 9) 佐藤良彦, 平沢博一, 長田宣夫, ほか: 日獣会誌, 38, 45~48 (1985).
- 10) SCHIEFER, B., WARD, G. E. and MOFFATT, R. E.: *Vet. Patol.*, 15, 313~321 (1978).
- 11) 清水高正: 日獣会誌, 30, 367~373 (1977).
- 12) 清水高正: 牛病学, 大森常良, 安藤敬太郎, 石谷類造ら編, 第1版, 582~594, 近代出版, 東京 (1981).
- 13) 清水高正: 獣医界, 125, 53~61 (1984).
- 14) 鵜飼重明, 武居和樹, 藤田 耕, ほか: 日獣会誌, 38, 385~389 (1985).
- 15) 山下秀之, 野田雅博, 山口昌己: 日獣会誌, 32, 25~30 (1982).