

第 2 部

子牛のクリプトスポリジウム症発生事例

東部家畜保健衛生所 ○池永直浩 相川忠仁 他

【はじめに】

クリプトスポリジウムは、コクシジウム原虫の一種でほとんどの動物に自然感染が認められる。子牛は感受性が特に高く、1～数個のオーシストを摂取しただけで腸管粘膜上皮の著しい損傷による下痢を発症する。平成31年4月、管内一酪農場において下痢を呈して死亡した子牛についてクリプトスポリジウム症と診断したので、その概要について報告する。

《発生概要》

・H30年11月頃～ 体調不良(腸炎・肺炎)の子牛、例年より多い
・H31年4月14日 元気消失、発熱等の症状で1ヶ月経過した子牛が死亡(38日齢) →病性鑑定(臍帯炎)
・4月16日 10日齢より水様性下痢、低体温の症状を呈した子牛死亡(14日齢) →病性鑑定(No1)
・4月17日 9日齢よりNo1と同様の症状を呈した子牛死亡(14日齢) →病性鑑定(No2)
・同じ場所で飼養されている子牛(同エリア子牛群)でも下痢症状見られる

【発生概要】

当該農場では、NOSAIの獣医師からの聞き取りによると平成30年の11月頃より育成・子牛群で体調不良、肺炎、腸炎の症状が例年より多く見られていた様である。出生した子牛は農場の一角に設置された14個のカーフハッチで、約60日齢まで飼養されていた。平成31年4月14日に、4番ハッチで飼養されていた子牛が出生直後より元気消失や発熱等の症状が1ヶ月ほど続き38日齢で死亡したため、病性鑑定を実施し、化膿性臍帯炎と診断した。その2日後に、3番ハッチで飼養されていた子牛が10日齢から水様性下痢、低体温の症状を呈し、抗生物質や補液による治療が施されたが、14日齢で死亡したため病性鑑定を実施し、この事例をNo1とする。さらに翌日、5番ハッチで飼養されていた子牛が9日齢から同様の症状を呈し、同じく治療が施されたが、死亡したため病性鑑定を実施し、この事例をNo2とする。このとき、他のカーフハッチで飼養されている子牛でも数頭で下痢症状が確認された(以下、同エリア子牛群)。(表-1)

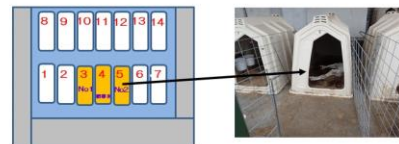


表-1

【材料と方法】

寄生虫検査として、死亡子牛2頭の直腸便および同エリア子牛12頭の糞便を材料にクリプトスポリジウムの検査としてスライドグラスに直接塗抹後、抗酸染色を実施した。また、アイメリア属のコクシジウムや通常の寄生虫卵の検査としてシヨ糖浮遊法を実施した(表-2)。死亡子牛2頭の主要5臓器および脳、上部消化管、腸間膜リンパ節、肺門リンパ節、鼻腔スワブ、気管スワブ等および同エリア子牛の糞便を材料とし、細菌検査およびウイルス検査を実施した(表-3)。病理検査として、主要5臓器、

《材料と方法》

(寄生虫検査)

材料:①死亡子牛2頭の直腸便、②同エリア子牛群12頭の糞便

方法:(A)スライドグラスに直接塗抹後、抗酸染色(①②)

(B)シヨ糖浮遊法(①)

(細菌検査)

(1)分離培養

材料:①死亡子牛2頭の主要臓器、上部消化管、脳

②同エリア子牛群12頭の糞便

方法:(A)羊血液寒天培地(37°C・48時間・5%CO₂培養)(①)

(B)DHL寒天培地(37°C・24時間・好気培養)(①②)

(C)ES-II寒天培地(37°C・24時間・好気培養)(①②)

(2)マイコプラズマのPCR検査

材料:死亡子牛の2頭の肺



表-2

消化器、リンパ節、脳等を材料に HE 染色を実施し、腸管については PAS 染色、グラム染色、抗酸菌染色を実施した。また、クリプトスポリジウム・パルバムのモノクローナル抗体を用いて免疫組織化学染色を実施した。

【結果】

(剖検所見) 2 頭ともに消瘦が著しく脱水により眼球が陥没しており、肛門周囲は下痢で汚れていた。腸管内は白黄色のミルク様の液体が 2 頭ともに貯留しており、No2 では粘膜面が赤色を呈していた。右肺前葉は赤と橙赤色のモザイク様を呈していた(図-1)。

(寄生虫検査) クリプトスポリジウムのオーシストが死亡子牛 2 頭を含む 9 頭で確認された(表-4、図-2)。

(細菌検査) 死亡子牛の臓器および同エリア子牛の糞便のどちらからも有意な菌は分離されなかった。

(ウイルス検査) No1 では鼻腔スワブ・気管スワブから、No2 では気管スワブから牛コロナウイルスが分離された。PCR 検査では、牛コロナウイルスの特異遺伝子が No1 では鼻腔スワブ・気管スワブから、No2 では肺・気管スワブから検出された。また、牛パラインフルエンザ 3 型の特異遺伝子が No1 では気管スワブ、No2 では鼻腔スワブから検出された(表-5)。

(病理検査) 2 頭ともに腸管(十二指腸～直腸)は、び慢性に粘膜上皮が剥離・変性、血管は充うっ血し、粘膜固有層にはリンパ球、形質細胞が重度に浸潤していた(図-3)。No1 では結腸、No2 では盲腸、結腸、直腸の陰窩内にクリプトスポリジウムのオーシストが見られた(図-4)。クリプトスポリジウムの免疫組織化学染色では同部位に一致して陽性反応が確認された(図-5)。PAS 染色では、赤紫色にオーシストが染まった。抗酸菌染色、グラム染色で染まってくるものは認められなかった。肺では 2 頭ともに小葉単位で散在性に細気管支内および肺胞腔内に単球、形質細胞、リンパ球、赤血球が軽度から重度に浸潤していた。

《材料と方法》

(ウイルス検査)

(1) ウイルス分離

対象	材料	方法
IBR PI3 BVD-MD 牛アデノウイルス 牛コロナウイルス	肺、肝、腎、脾、鼻腔スワブ、気管スワブ、脳、肺門リンパ節、(上部消化管)、(腸間膜リンパ節)	MDBK-SV細胞にて3代静置培養
	肺、鼻腔スワブ、気管スワブ	HRT-18G細胞にて3代静置培養

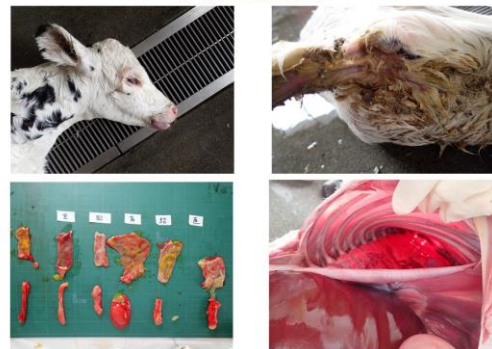
(2) PCR検査

対象	材料	方法
RS PI3 BVD-MD 牛コロナウイルス	肺、鼻腔スワブ、気管スワブ	マルチプレックスPCR
IBR	肺、鼻腔スワブ、気管スワブ	Nested-PCR
牛コロナウイルス 牛ロタウイルス 牛トロウイルス	上部消化管	マルチプレックスPCR
牛アデノウイルス	肺、上部消化管、(腸間膜リンパ節)	Nested-PCR

※()はNo2のみ

表-3

《検査結果》



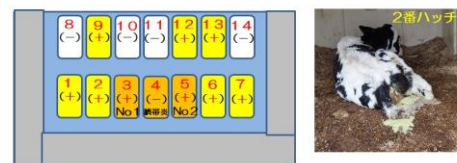
《検査結果》

(寄生虫検査)

抗酸染色法 : クリプトスポリジウムオーシスト(+)

9/14頭陽性(陽性率64%)

シヨ糖浮遊法 : Eimeria属オーシスト、寄生虫卵(-)



(細菌検査) : 有意な菌は分離されず

表-4

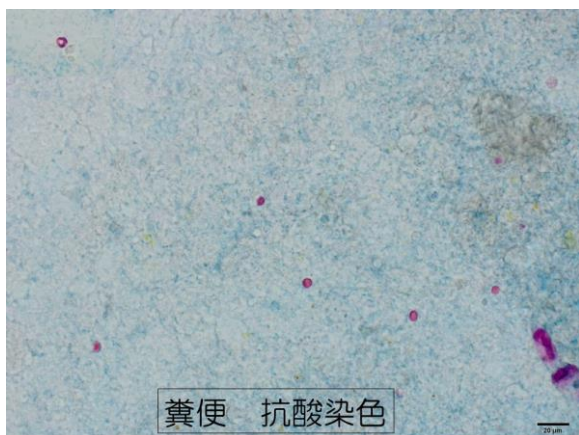


図-2

《検査結果》

(ウイルス検査)
ウイルス分離

ターゲット	結果	分離部位
牛コロナウイルス	+ (No1, No2)	No1(鼻腔・気管スワブ)、No2(気管スワブ)
IBR	-	
PI3	-	
BVD・MD	-	
牛アデノウイルス	-	

PCR検査

ターゲット	結果	分離部位
(牛呼吸器マルチプレックスPCR) 牛コロナウイルス	+ (No1, No2)	No1(鼻腔・気管スワブ)、No2(肺、気管スワブ)
PI3	+ (No1, No2)	No1(鼻腔スワブ)、No2(気管スワブ)
RS	-	
BVD・MD	-	
IBR	-	
(牛消化器マルチプレックスPCR) 牛コロナウイルス	-	
牛ロタウイルス	-	
牛トロウイルス	-	
牛アデノウイルス	-	

表-5

《検査結果》

(病理検査)

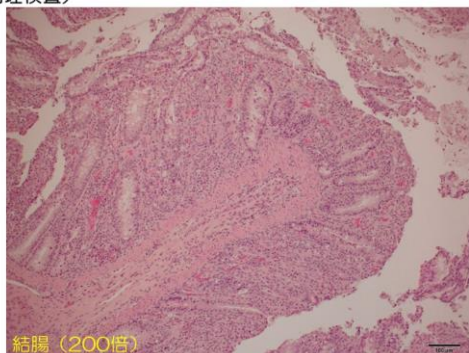


図-3

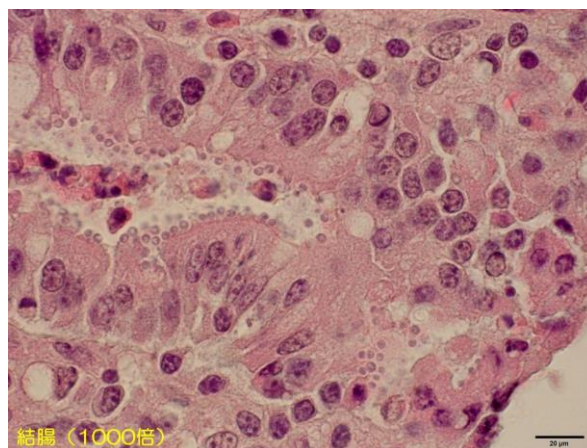


図-4

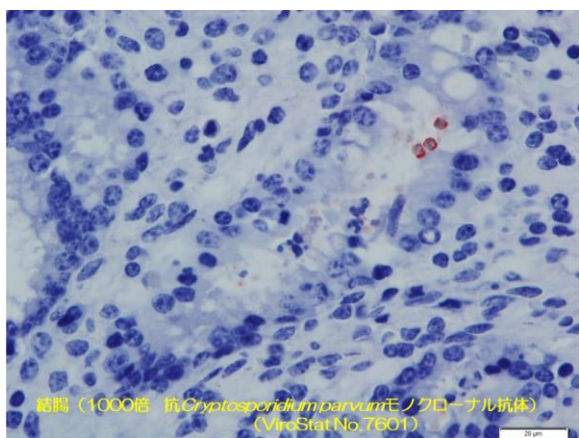


図-5

【まとめ】

寄生虫検査では、死亡子牛2頭でクリプトスポリジウムのオーシストが確認され、病理検査よりクリプトスポリジウムが寄生したカタル性腸炎が認められたことから、2頭ともにクリプトスポリジウム症と診断した。また、ウイルス検査で死亡子牛2頭の呼吸器材料から牛コロナウイルスが検出され、病理検査より肺で細気管支炎像が見られたことから、牛コロナウイルス病と診断した。牛パラインフルエンザについては、分離はされな

かったが特異遺伝子が検出され、病理検査で細胞質内封入体や合胞体は確認できなかったものの、細気管支炎像が見られたことから病変形成に関与していたのではないかと考えられた。以上の結果から、クリプトスポリジウム症による下痢を主病因として、牛コロナウイルス病、牛パラインフルエンザが複合感染していたと考えられた(表-6)。

対策として、感染環を切り切るため哺乳子牛の飼養場所を別の場所に移し、カーフハッチの洗浄消毒や元の飼養場所のコンクリートを火炎滅菌、石灰散布を畜主が速やかに行った結果、終息に至った(表-7)。

最後に、クリプトスポリジウムの免疫組織化学染色を実施していただいた、農研機構動物衛生研究部門病理ユニットの芝原友之先生に深謝いたします。

《結果(まとめ)》

	No1	No2	同エリア子牛群
寄生虫検査	クリプトスポリジウム	クリプトスポリジウム	クリプトスポリジウム (7頭陽性)
ウイルス検査	牛コロナウイルス (分離・PCR 呼吸器) PI3(PCR 呼吸器)	牛コロナウイルス (分離・PCR 呼吸器) PI3(PCR 呼吸器)	
細菌検査	-	-	-
病理検査	腸管:クリプトスポリジウムが寄生したカタル性腸炎(結腸) 肺:細気管支炎 (好酸性細胞質内封入体や合胞体は見られず)	腸管:クリプトスポリジウムが寄生したカタル性腸炎(盲腸、結腸、直腸) 肺:細気管支炎 (好酸性細胞質内封入体や合胞体は見られず)	
疾病診断	クリプトスポリジウム症 牛コロナウイルス病 (呼吸器) (牛パラインフルエンザ)	クリプトスポリジウム症 牛コロナウイルス病 (呼吸器) (牛パラインフルエンザ)	クリプトスポリジウム症 (12頭中7頭)

表-6

《まとめ》

- 14頭中9頭からクリプトスポリジウムのオーシスト検出(陽性率64%)
- 死亡子牛2頭は、クリプトスポリジウム症、牛コロナウイルス病、牛パラインフルエンザの複合感染



- 哺乳子牛の飼養場所の変更
- カーフハッチの洗浄消毒
- 元の飼養場所を火炎滅菌、石灰散布

畜主の速やかな対応により終息

表-7

県内で発生した豚熱（CSF）検査について

東部家畜保健衛生所 ○水谷直子 相川忠仁

【はじめに】

平成 30 年 9 月、国内で 26 年ぶりとなる豚熱（CSF）の発生が確認されてから、山梨県においても、一と畜場で確認、一農場で発生があったため、その検査対応について概要を報告する。

【発生概要】

事例 1（と畜場）：令和元年 9 月 11 日、本県食肉衛生検査所から、県外から出荷された肥育豚について CSF を疑う通報があり、病性鑑定を実施した。患畜確定後の 9 月 15 日から、本事例とと畜場を介し交差汚染の可能性のある監視対象農場の県内 5 農場について検査を実施し陰性を確認した。また、監視対象農場ではないが、と畜場を介し発生農場への持ち込みの可能性のある 1 農場についても検査を実施し陰性を確認した。その後、9 月 17 日に同と畜場を利用している県外の 1 農場（9 月 14 日に監視対象農場となっていた）で CSF の発生があったため、県内の監視対象農場 2 農場及び発生農場への持ち込みの可能性のある 2 農場の計 4 農場について検査を実施し、陰性を確認した。

また、7 農場の監視対象農場の解除のための検査を 9 月 25 日から開始したところ、A 農場以外の 6 農場で陰性、A 農場については、種豚舎で ELISA 陽性 3 頭が認められたが、遺伝子検査で陰性を確認し、10 月 19 日、A 農場を含めた全監視対象農場が解除された（表 1）。

事例 2（A 農場）：令和元年 11 月 14 日、事例 1 で監視解除となった A 農場（豚一貫経営、飼養頭数 890 頭）から、分娩舎の飼養豚が異常を呈しているとの届出を受け、立入検査及び精密検査を実施した（表 2 及び図 1）。なお、当該農場は 10 月 30 日に県内で捕獲された CSF 感染野生イノシシ事例を受け、監視対象農場に指定されていた。

表 1 事例 1 経緯

令和元年 9 月 12 日	食肉衛生検査所から県外からの出荷豚について CSF を疑う通報 ・死亡豚 1 頭、同農場のと体 3 頭の病性鑑定 ・遺伝子・FA ともに陽性、動衛研へ病性鑑定（シークエンス）依頼
9 月 13 日	患畜確定
9 月 15 日	と畜場の防疫措置開始、監視対象農場等（6 農場）検査開始
9 月 17 日	と畜場を利用していた県外農場での CSF 発生に伴い、監視対象農場等 4 農場について検査開始
9 月 19 日	監視対象農場等検査で全農場陰性確認
9 月 25 日	監視対象農場解除のための検査開始
10 月 10 日	監視対象農場解除のための検査にて監視対象 A 農場で ELISA 陽性 3 頭、PCR 陰性
11 日	中和試験実施
10 月 18 日	中和試験で CSF を否定できなかったため、PCR 実施→陰性
10 月 19 日	全監視対象農場解除

表2 事例2 (A農場) 経緯

10月30日	捕獲野生イノシシでCSF陽性が確認され、監視対象農場に指定
11月14日	異常通報(離乳豚発熱・元気消失)があり、病性鑑定 分娩舎20頭の血液検査・ELISA・遺伝子検査陽性
11月15日	陽性4頭の鑑定殺を実施、遺伝子陽性、動衛研へ病性鑑定 (シーケンス)依頼 疫学調査のための殺処分前検査、環境検査
11月16日	動物衛生研究部門の遺伝子検査で患畜と判定
11月17日	殺処分完了、県内養豚農家でワクチン接種開始
11月19日	防疫措置完了
12月26日	全監視対象農場解除



図1 A農場見取り図

【材料・方法・結果】

○事例1

(1) 通報時の検査

死亡豚1頭について現地解剖を行い、扁桃、脾臓、腎臓を採材した。また、同農場のと体3頭の腎臓を採材した。蛍光抗体法 (FA) については、死亡豚の扁桃について、“京都微研”豚コレラ-FA (京都微研) を用いて実施し、陽性を確認した。遺伝子検査については、死亡豚の扁桃、脾臓、腎臓、枝肉3頭の腎臓を用いて、RNA抽出 (High Pure Viral RNA Kit (Roche)) 後、Vilcekら [1] のプライマーを用いてペスチウイルスに特異的な RT-PCR (OneStep RT-PCR (QIAGEN)) 及び RFLP (BglI (NEB社)) を実施したところ、CSFV 遺伝子を確認したため、遺伝子解析を動物衛生研究部門へ依頼し、患畜であることが確定した。

(2) 監視対象農場等の検査

発生直後の検査として、本事例でと畜場を介し交差汚染の可能性のある監視対象農

場、及び監視対象農場ではないが、と畜場を介し発生農場への持ち込みの可能性のある県内養豚場計 10 農場 584 頭について、全自動血球計数器セルタック α MEK-6358(日本光電)を用いて血液検査(白血球数計測,白血球数 1 万個/ μ l 以下を減少と判定)、市販の CSF ELISA キット(豚コレラエライザキット II、J JNC)を用いて抗体検査(ELISA)及び 5 頭 1 プールとして(1)と同様の方法で遺伝子検査を実施し、全ての陰性を確認した。

9 月 25 日から順次、監視対象農場解除のための検査として、延べ 433 頭について体温測定、白血球数計測、ELISA を実施し、体温 40℃以上又は白血球減少検体の 232 頭を対象に遺伝子検査を実施(1 農場については体温測定実施せず 5 検体 1 プールで遺伝子検査を実施)したところ、A 農場の種豚舎の 3 頭について ELISA 陽性かつ遺伝子検査陰性を確認したため、中和試験を実施した。中和試験の結果、CSF を否定できなかったため、再度当該豚 3 頭を含めた 56 頭について遺伝子検査(個別 PCR)及び ELISA を実施したところ、当該の 3 頭(PCR 陰性、ELISA 陽性)を除き陰性を確認し、10 月 19 日、A 農場を含めた全農場で監視が解除された。なお、種豚舎の豚は、分娩 2 日前頃に分娩舎へ移動し、離乳を終えると種豚舎又は交配豚舎へ移動するフローとなっており、ELISA 陽性の 3 頭は、5~6 月の分娩を最後に移動はなかった。

○事例 2

(1) 通報時の検査

異常豚がいた分娩舎 20 頭の採血を行い、白血球数計測、ELISA 及び遺伝子検査を実施したところ、20 頭中、白血球減少は 10 頭、ELISA は 9 頭、遺伝子検査は 16 頭で陽性が認められ、CSFV 遺伝子陽性個体 4 頭について鑑定殺を行った。また、陽性検体については、Vilcek ら 1)のプライマーを用いてリアルタイム PCR (One Step SYBR PrimeScript RT-PCR Kit II (TaKaRa))にて定量した(表 3)。なお、陽性コントロールは、Vetmax gold BVDV PI Detection Kit(rRT-PCR)の付属 PC(10,000copies/ μ L)を使用して検量線を作成し、各検体の遺伝子量を推測した。

FA については、扁桃を用いて実施し、4 頭中 3 頭で陽性を確認した。遺伝子検査については、CSFV 遺伝子を確認し、動物衛生研究部門での遺伝子解析の結果、患者と確定された。また、動物衛生研究部門による CSFV の全ゲノム情報を用いた分子系統樹解析の結果、事例 2 のウイルスは、事例 1 で検出された遺伝子とは異なるクラスターを形成し、愛知県、岐阜県及び長野県で発生した事例と近縁であった(図 2)。

表 3 通報時検査及び遺伝子定量結果

個体No.	体温	畜舎	月齢、産歴	WBC数	ELISA	S/P比	コピー数	ベスチPCR	解剖
1	38.8	分娩舎	2ヶ月齢	7,300	-	0.007	20902.281	+	
2	39.1	分娩舎	2ヶ月齢	12,000	+	0.313	32771.387	+	
3	39.6	分娩舎	2ヶ月齢	10,900	-	0.043	29545.221	+	
4	40.0	分娩舎	2ヶ月齢	6,000	-	0.000	14709.049	+	No.1
5	39.2	分娩舎	2ヶ月齢	8,100	-	0.004	43344.035	+	No.2
6	37.7	分娩舎	2ヶ月齢	14,800	+	0.168	45026.438	+	
7	38.0	分娩舎	2ヶ月齢	17,300	+	0.414	50.579	+	
8	38.0	分娩舎	2ヶ月齢	5,200	+	0.311	23988.854	+	
9	37.2	分娩舎	2ヶ月齢	6,400	±	0.062	12107.387	+	
10	39.6	分娩舎	2ヶ月齢	9,300	+	0.117	36274.863	+	
11	37.5	分娩舎	2産以上	15,500	+	0.985	0.000	-	
12	37.1	分娩舎	2産以上	10,000	+	0.727	0.000	-	
13	37.1	分娩舎	2産以上	14,300	+	1.023	0.000	-	
14	37.8	分娩舎	2産以上	25,200	+	0.830	0.004	-	
15	37.4	分娩舎	2産以上	12,200	±	0.056	71.358	+	
16	39.6	分娩舎	2ヶ月齢	5,600	-	0.004	15798.623	+	
17	39.1	分娩舎	2ヶ月齢	5,100	-	0.025	43372.051	+	No.3
18	40.0	分娩舎	2ヶ月齢	7,100	-	0.008	12882.708	+	
19	38.5	分娩舎	1ヶ月齢	13,600	-	0.020	70676.914	+	No.4
20	38.8	分娩舎	1ヶ月齢	6,100	-	0.016	432.066	+	

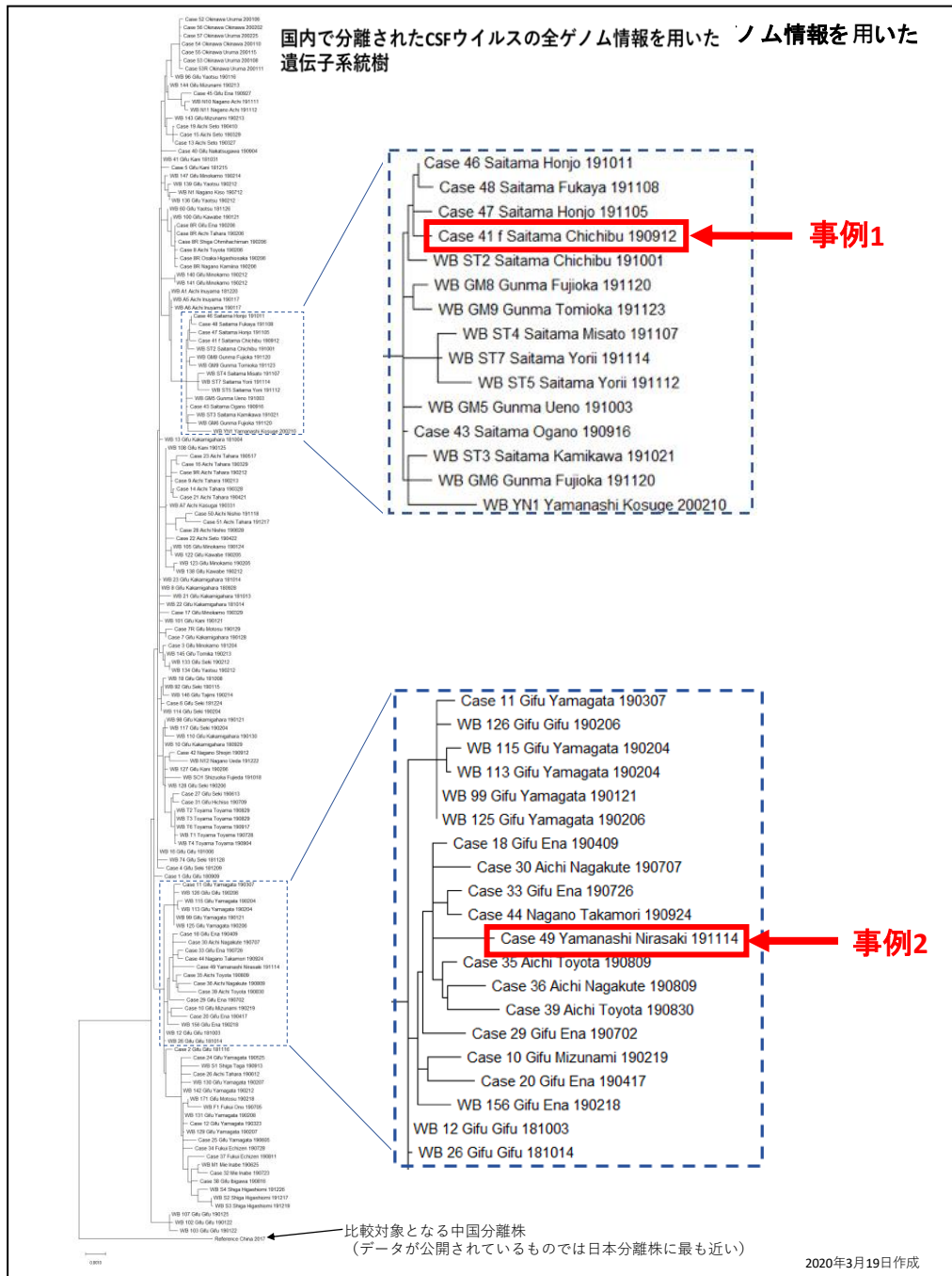


図2 国内で分離されたCSFウイルスの全ゲノム情報を用いた遺伝子系統樹

(2) 疫学関連及び周辺農場の検査

殺処分前検査として、63頭中29頭で遺伝子検査で陽性（複数豚舎で陽性）を確認した（図3）。陽性検体については、(1)通報時の検査と同様の方法で遺伝子量を推測した。環境検査については、50検体中、分娩舎13検体で遺伝子検査陽性（図4）、発生状況確認検査において、2農場70頭で陰性を確認した。種豚舎1のELISA陽性2頭については、事例1の10月10日の監視解除検査時は、1頭陽性、1頭陰性（陽転）であった。

殺処分前検査結果

白血球減少 (<1万個/μl)	ELISA	遺伝子検査	ELISA+PCR-
15/63	12/63 (疑陽性4/63)	29/63	9

畜舎	月齢、産期	WBC数	ELISA	PCRベスチ	コピー数
種豚 1	2産以上	17,400	+	-	0.0004
	2産以上	21,700	+	-	undetermined
	2産以上	10,400	-	-	NT
	2産以上	18,000	-	-	NT
	2産以上	21,000	-	-	NT
	2産以上	15,400	-	-	NT
	産	17,300	-	-	NT
	産	19,100	-	-	NT
	2産以上	22,000	-	-	NT
	2産以上	20,000	-	-	NT
交配舎	2産以上	5,300	-	+	161.70
	2産以上	23,400	+	-	8.66
	2産以上	14,000	+	-	undetermined
	2産以上	13,900	-	+	79.63
	2産以上	17,600	-	-	NT
	2産以上	10,500	±	-	0.13
	2産以上	3,000	-	+	494.07
	2産以上	5,700	-	+	11640.87
	2産以上	25,100	+	-	undetermined
	2産以上	5,400	+	+	10094.56
肥育 7	4ヶ月齢	1,600	-	+	57.72
	4ヶ月齢	15,700	-	-	NT
	4ヶ月齢	9,500	-	+	37.51
	4ヶ月齢	15,100	-	+	14.94
	4ヶ月齢	12,500	-	+	177.98
	4ヶ月齢	13,100	-	+	17.78
	4ヶ月齢	7,400	-	+	58.99
	4ヶ月齢	10,600	-	+	22.40
	4ヶ月齢	12,800	-	+	191.56
	4ヶ月齢	8,200	-	+	117.82
肥育 3	6ヶ月齢	8,400	±	+	63.15
	6ヶ月齢	17,200	-	-	NT
	6ヶ月齢	15,800	±	-	0.030
	6ヶ月齢	3,900	+	+	359.854
	6ヶ月齢	13,200	-	-	NT
	6ヶ月齢	16,700	-	+	3.607
	6ヶ月齢	23,000	-	-	NT
	6ヶ月齢	19,500	-	-	NT
	6ヶ月齢	11,400	-	+	68.930
	6ヶ月齢	26,500	-	+	34.739
肥育 6	6ヶ月齢	19,800	-	-	NT
	6ヶ月齢	16,900	-	+	7.857
	6ヶ月齢	3,600	+	+	11783.321
	6ヶ月齢	10,700	-	-	NT
	6ヶ月齢	24,900	-	-	NT
	6ヶ月齢	22,300	-	-	NT
	6ヶ月齢	8,100	-	+	40.966
	6ヶ月齢	8,000	-	+	146.989
	6ヶ月齢	22,500	-	-	NT
	6ヶ月齢	12,200	-	+	260.032
肥育 8	5ヶ月齢	20,900	-	-	-
	5ヶ月齢	15,900	+	-	非特異
	5ヶ月齢	10,400	-	+	65.926
	5ヶ月齢	14,000	-	+	22.596
	5ヶ月齢	19,900	+	-	undetermined
	5ヶ月齢	26,800	+	-	undetermined
	5ヶ月齢	9,800	-	+	12.360
	5ヶ月齢	18,100	±	+	146.466
	5ヶ月齢	23,000	+	-	undetermined
	5ヶ月齢	8,100	-	+	343.107
隔離豚舎	6ヶ月齢	28,100	-	-	NT
	6ヶ月齢	22,400	-	-	NT
	6ヶ月齢	12,100	-	-	NT

ELISA	PCR	該当豚舎
-	+	肥育舎7・3
+	+	分娩舎・交配舎・肥育舎6・8
+	-	種豚舎1

図 3 殺処分前検査結果

環境検査

全て分娩豚舎で検出

分娩舎	交配豚舎	肥育⑦	肥育③	種豚舎	肥育⑥	肥育⑧	隔離豚舎	車両
13/26	0/4	0/3	0/3	0/2	0/3	0/4	0/2	0/3

分娩舎

No.	採材材料	備考	ベスチ(PCR)	No.	採材材料	備考	ベスチ(PCR)
1	一輪車タイヤ		-	14	一輪車タイヤ③		-
2	出入口扉		-	15	床⑦	No.17豚房前	+
3	壁①	No.53豚房前	+	16	床⑧	No.10豚房前	+
4	床①	No.53豚房前	+	17	壁⑤	No.20豚房後ろ	-
5	壁②	No.60豚房前	+	18	床⑨	No.20豚房後ろ	+
6	床②	No.60豚房前	+	19	壁⑥	No.10豚房後ろ	+
7	壁③	No.66豚房前	+	20	床⑩	No.10豚房後ろ	+
8	床③	No.66豚房前	-	21	奥・ほこり	No.24豚房上部	-
9	壁④	豚舎奥	-	22	中間・ほこり	中央通路付近ほこり	-
10	床④	豚舎奥	-	23	入口・ほこり		-
11	床⑤	No.45豚房前	+	24	エサバケツ		-
12	床⑥	No.29豚房前	+	25	棚		+
13	一輪車タイヤ②		-	26	赤いレバケツ	No.28豚房上	-

環境検査

PCR陽性豚付近の床・壁で検出

分娩豚舎 13/26

床・・・④⑥⑧⑩⑪⑫⑬⑮⑯⑰⑲ 赤：陽性
壁・・・③⑤⑦⑨⑪⑲ 青：陰性

■ PCR陽性豚の豚房

図 4 環境検査結果

【考察】

両事例ともに CSF と診断した。

事例 1 で監視対象農場となった A 農場については、一度監視解除となったものの、その後 CSF が発生した（事例 2）。CSFV の全ゲノム解析の結果から、事例 2 は事例 1 とは異なる他県での発生事例と近縁であったこと、10 月下旬に A 農場の 10km 圏内の地点で CSF 感染イノシシが確認されていたことから、ウイルス侵入経路は感染野生イノシシ由来であると考えられた。

事例 2 において、発生農場での殺処分前検査の結果から、初発豚舎は ELISA 陽性かつ PCR 陰性の種豚舎 1 と思われたが、種豚舎 1 は監視対象農場解除の検査で PCR 陰性であったことや陽転していた豚は 1 頭のみであったことから、初発豚舎と言い切るには疑問が残った。ELISA 陽性かつ PCR 陽性の豚舎は、分娩舎・交配舎・肥育舎 6 及び 8 の 4 豚舎であったが、遺伝子量については分娩舎が最も多く、環境検査も分娩舎のみで陽性であったことから、分娩舎での感染による環境等の汚染により飼料運搬等の日常の飼養管理を介して周囲の豚舎に感染が拡大したと推測された。種豚舎 1 の 1 頭の陽転についても、種豚舎 1-分娩舎間で豚の移動があることから、分娩舎からウイルスが持ち込まれた可能性が考えられるが、陽転前からウイルスが種豚舎 1 内に潜伏していた可能性も否定できず、初発豚舎の断定には至らなかった。

ウイルス侵入時期については、PCR 陰性・ELISA 陽性個体が複数豚舎の繁殖豚及び肥育豚で確認されたこと等から、9 月下旬（1 ヶ月半前）から 10 月中旬（1 ヶ月前）頃と推測された [2]。しかし、発生 1 ヶ月前には監視対象農場解除検査で陰性を確認していたことから、今回実施した検査・採材方法では侵入初期のウイルスを検出できなかったことが示唆された。

清浄性確認検査や監視対象農場解除のための検査等の採材については、指針等では「各豚舎から無作為に少なくとも 5 頭」とあるが、採材する 5 頭の選択及びその頭数が結果に影響を及ぼす可能性が考えられた。

【参考文献】

- [1] Vilcek S, et al. Arch Virol 136. 309-323. (1994)
- [2] 農林水産省拡大豚コレラ疫学調査チーム検討会の結果概要
<https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/csf/attach/pdf/sinchaku-11.pdf>

Clostridium novyiによる豚の突然死

東部家畜保健衛生所 ○土屋可奈 相川忠仁

【はじめに】

Clostridium novyi (*C. novyi*) はグラム陽性の嫌気性菌で嫌気要求性が高く、市販のガスパック法では分離が困難であるとの報告もある。また、リパーゼ、レシチナーゼの両方もしくは一方を産生するため、卵黄を添加した培地ではコロニー周辺が白濁する卵黄反応を示す。

*C. novyi*はタイプA～Dの4種類に分類される。タイプAはガス壊疽、タイプBは伝染性壊死性肝炎、タイプDは細菌性血色素尿の原因になるとされており、タイプCには病原性がないと言われている。また、タイプB感染は牛や羊での報告はあるが、豚ではまれで、タイプD感染は豚での報告はない。

このような中、令和元年7月に県内の養豚場で*C. novyi*による豚の突然死が発生し、分離菌株について解析したのでその概要を報告する。

【発生概要】

農場は母豚200頭規模の一貫経営。当該豚は平成27年生まれの42ヶ月齢、病性鑑定前の1ヶ月程前の6月に分娩していたが、死産等は認められなかった。病性鑑定前日の7月8日の夕方には異常は見られなかったが、翌7月9日朝に死亡が確認されたため、同日午前中に病性鑑定を実施した。当該豚に治療歴はなく、同居豚及び当該豚の産子にも異常は認められなかった。また、同農場では5年程前に*C. novyi*による母豚の突然死が確認されていた。

【剖検所見】

剖検時、目立った外傷は認められなかった。各臓器について、肝臓が全域にわたりスポンジ状であり、脆く崩れる状態であった。また、脳は軟化していた。多量の血様腹水が貯留しており、胸水、心嚢水も認められた。(図. 1)

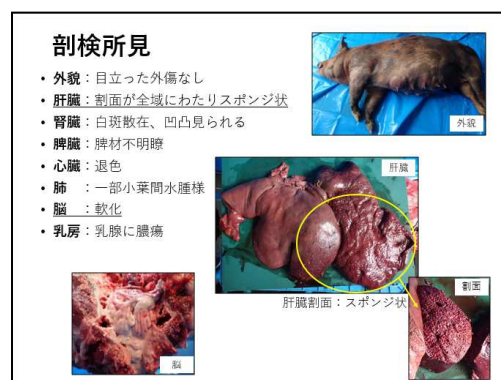


図. 1

【材料及び方法】

脳及び主要臓器、胸水、腹水、心嚢水、十二指腸内容を用いて、①チョコレート寒天培地（チョコ寒）、DHL、卵黄加 GAM 寒天培地（卵黄加 GAM）で分離培養、卵黄加 CW 寒天培地（卵黄加 CW）を用いて *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) の定量を行った。

また、卵黄加 GAM 上で継代困難なコロニーが見られたため、②臓器をクックドミート培地で培養後、卵黄加 GAM を用いて菌の分離を試みた。菌の同定には Sasaki. Y ら

の PCR を用いた。また、追加検査として 16S rRNA の解析及び α 毒素の検出を依頼した。

【培養①】

チョコ寒及び DHL では有意な菌は分離されず、卵黄加 CW において *C. perfringens* を疑うコロニーは認められなかった。卵黄加 GAM を用いた嫌気培養では脾臓、胸水、心嚢水から卵黄反応陽性の微小コロニーが確認されたが、それらは継代が困難であった。また、肝臓、腹水から卵黄反応陽性の広がったコロニーが検出され、市販の同定キットに供したところ、同定不能（反応なし）となった。

【培養②】

寒天培地では継代困難なコロニーが認められたため、より嫌気性菌の培養に適したクックドミート培地を用いて菌の分離を試みた。

各臓器をクックドミート培地で培養したところ、肝臓、心臓、胸水、腹水、心嚢水の培養上清から *C. novyi* タイプ B の遺伝子が検出された。PCR 陽性検体をクックドミート培地から卵黄加 GAM に接種し、*C. novyi* タイプ B の単離を試みたところ、肉眼的には卵黄反応のみのもの、盛り上がったもの、広がったものの 3 種類のコロニーが観察された（図. 2）。

これらを継代したところ、広がったコロニー、盛り上がったコロニーはすべて継代可能であったが、卵黄反応のみのコロニーは肝臓由来の 1 株を除き、継代不可能であり、嫌気要求性が高いことが推察された。

コロニー形態及び嫌気要求性に差が認められたため、Sasaki. Y らの PCR で菌種を確認したところすべて *C. novyi* タイプ B と判断された（図. 3）。

また、市販のキットで同定不能だった菌についても Sasaki. Y らの PCR により *C. novyi* タイプ B であることが判明した。

【16S rRNA シーケンス解析】

当所で実施した Sasaki. Y らの PCR では分離株すべて *C. novyi* タイプ B であると判断されたが、コロニー形態が様々であり、嫌気要求性に差があることが推察されたことから、さらに精査するため、①肝臓由来株（卵黄反応のみ）②心臓由来株（広がったコロニー）③胸水由来株（盛り上がったコロニー）④腹水由来株（広がったコロニー）の 4 株について 16S rRNA シーケンス解析を依頼した。

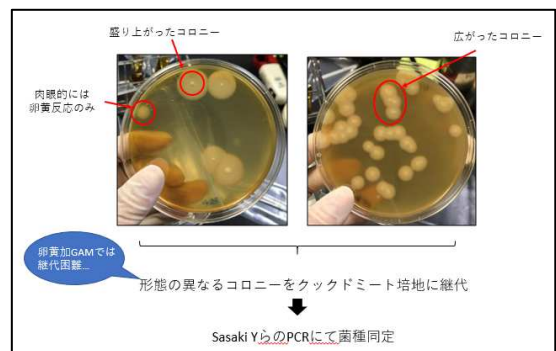


図. 2

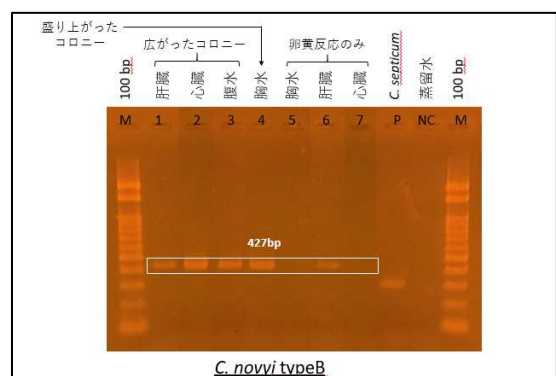


図. 3

この結果、4株すべての遺伝子配列が一致し、その配列が *C. novyi* タイプ B 及びタイプ D の両方と 100%一致した。このため、この解析方法ではタイプ B とタイプ D の区別が困難であることが明らかとなった。

【 α 毒素遺伝子の検出】

C. novyi タイプ B が α 毒素を産生する一方、タイプ D は α 毒素を産生しないため、 α 毒素遺伝子を検出することで両者を区別することが可能である。この結果、今回分離された 4 株すべてが α 毒素遺伝子を保有していないことが明らかとなり、*C. novyi* タイプ D である可能性が示唆された。

【まとめ】

当所で実施した Sasaki. Y らの PCR はフラジェリンをターゲットとしており、気腫疽及び悪性水腫の原因菌を識別可能である。この PCR 検査の結果、427bp にバンドが確認され、*C. novyi* タイプ B であると判断された。一方、 α 毒素遺伝子検出 PCR では、*C. novyi* タイプ B の多くが保有するとされる α 毒素遺伝子が検出されなかったことから、タイプ D の可能性が高いと判断された。これらの検査結果より、今回分離された株は「*C. novyi* タイプ B のフラジェリンを持つタイプ D である」もしくは「 α 毒素遺伝子を欠損したタイプ B である」という 2 つの可能性が示唆された。

【考察】

突然死の原因について、複数の臓器から *C. novyi* が検出され、ウイルスなど他の病原体が検出されなかったことから、本菌が今回の突然死に関与したと考えられた。

また、分離株のコロニー形態が異なっていた点については、各臓器から分離された菌株がいずれも遺伝子的特徴が一致していること、後日卵黄加 GAM に再接種したところ、すべて同様のコロニー形態を示したことから、菌の状態によりコロニー形態に差が出るものと考えられた。

遺伝子的には、「*C. novyi* タイプ B のフラジェリンを持つタイプ D である」もしくは「 α 毒素遺伝子を欠損したタイプ B である」という 2 つの可能性が示唆されたが、本菌がいずれに該当するかは全ゲノム解析等、より詳細な検査が必要であり、解明には至っていない。

豚における タイプ B 感染は報告が少なく、タイプ D 感染については報告がないため、いずれであっても非常にまれな症例であると考えられる。*C. novyi* は他の嫌気性菌に比べ、培養が困難であることから、世界的にも報告は少なく、さらなるデータの蓄積が望まれる。