

【原 著】 産業動物

*Ureaplasma diversum*の関与を疑う子牛の出生直後の死亡事例

溝口 達也¹⁾ 相川 文¹⁾ 大和田真紀¹⁾
上野 拓²⁾ 小林 貫爾³⁾

1) 北海道根室家畜保健衛生所 (〒086-0214 野付郡別海町別海緑町69)

2) 北海道網走家畜保健衛生所 (〒090-1108 北見市大正323-5)

3) 小林家畜病院 (〒086-1108 標津郡中標津町西8条南9丁目1-3)

要 約

根室管内の農場で出生直後に死亡したホルスタイン種子牛1頭の病勢鑑定を実施した。剖検所見では、肺にびまん性の暗赤色化を認め、病理組織学的検査では、気管支腔および肺胞腔内に単核細胞の浸潤、肺胞壁の軽度肥厚およびリンパ濾胞の形成が見られた。肺からマイコプラズマ属菌は分離されなかったが、*Ureaplasma diversum* (*U. diversum*) の遺伝子が検出された。本事例は病変の特徴と併せて *U. diversum* の関与が疑われ、牛の出生直後の死亡や異常産の原因究明では *U. diversum* の検査も考慮する必要があると考えられた。

キーワード：出生直後の死亡、リンパ濾胞の形成、*Ureaplasma diversum*

-----北獣会誌 66, 371~373 (2022)

Ureaplasma diversum (*U. diversum*) はマイコプラズマ科ウレプラズマ属に属する菌である。生殖器疾患、流産胎子、肺炎、角膜炎および乳房炎等のさまざまな病変部から分離され、多くの疾患に関与する一方で、健康な牛の鼻腔、泌尿生殖器、精液からの分離も報告されている^[1-3]。今回、*U. diversum* の遺伝子が検出された肺炎病変を主徴とする牛の出生直後の死亡事例に遭遇したため、概要を報告する。

材料および方法

発生の概要：本農場は酪農場（成牛161頭、育成牛79頭、哺育牛8頭飼養）で、今回の出生直後の死亡事例の発生前に、胎齢8カ月前後での異常産が令和2年4~11月に6例発生していた。本事例は令和2年11月11日に胎齢8.5カ月で出生後、翌日に死亡したホルスタイン種雄子牛（子牛）で、臨床獣医師は今回の事例を農場で発生している異常産に関連したものと考え、異常産原因究明のため当所へ病性鑑定を依頼した。なお、分娩時に母牛に異常は認められなかった。

材料：死亡した子牛およびその母牛血清

病理学的検査：病理解剖後、検査材料（心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、大脳、小脳、脳幹部、胸腺、胃、空腸、結腸および骨格筋）を10%中性緩衝ホルマリンで固定後、常法により病理組織標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色を実施した。

免疫組織化学的検査：肺について、一次抗体を抗 *U. diversum* 2型家兔血清（農研機構動衛研、東京）および抗 *M. bovis* 家兔血清（農研機構動衛研）を用いて、酵素抗体法による免疫組織化学検査を農研機構動物衛生研究部門に依頼した。陽性対照には、*U. diversum* 菌液を注入した正常牛の肝臓および *M. bovis* 菌液を注入した正常牛の肝臓を用いた。

一般細菌検査：心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、大脳、胸腺、胸水、腹水、胃内容物および胎盤について、5%羊血液寒天培地（TSA II 5% Sheep Blood Agar M：日本BD、東京）を用いて5%炭酸ガス下および嫌気下で、DHL寒天培地（KBM DHL寒天培地：コージンバイオ、埼玉）を用いて好気下で、それぞれ37℃、24~72時間培養を実施した。回腸内容物についてDHL寒天培地を用いて、大腸菌群数を測定した。母牛血清はブルセラ菌液

連絡責任者：溝口 達也 北海道根室家畜保健衛生所

〒086-0214 野付郡別海町別海緑町69

TEL：0153-75-2439 FAX：0153-75-2737 E-mail：mizoguchi.tatsuya@pref.hokkaido.lg.jp

(ブルセラ急速診断用菌液：化血研、熊本)を用いて急速凝集反応法を実施した。

マイコプラズマおよびウレアプラズマ検査：肺について、DNA添加変法Hayflick液体培地（マイコプラズマNK液体培地：関東化学、東京）および変法Taylor-Robinson液体培地^[4]を用いて好気培養を、DNA添加変法Hayflick寒天培地^[5]を用いて5%炭酸ガス培養を37℃ 3～7日間実施した。肺および37℃好気下で培養実施後の液体培地について、市販の試薬（QIAGEN QIAamp DNA Mini Kit：QIAGEN, Netherlands）でDNAを抽出し、*Mycoplasma bovis*、*M. bovis genitalium*、*M. dispar*、*M. bovis virrhinis*、*U. diversum*の遺伝子検査を実施した^[6-9]。

ウイルス学的検査：心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および脳について、ウイルス分離（MDBK細胞、BFM細胞）を実施した。同様の材料について、市販のキット（High Pure Viral Nucleic Acid Kit：Roche, USA）でRNAおよびDNAを抽出し、牛ウイルス性下痢ウイルス、牛伝染性鼻気管炎ウイルスの遺伝子検査を実施した^[10-11]。直腸内容物について市販の試薬（ディップスティック栄研ロタ：栄研化学、栃木）を用いてA型ロタウイルス抗原検査を実施した。

寄生虫学的検査：直腸内容物について市販の試薬（Dip-fit Cryptosporidium：Bio-X, Belgium）を用いて、*Cryptosporidium parvum*抗原を検出した。母牛の血清について*Neospora caninum*抗原を張り付けたスライドグラスを用いた間接蛍光抗体法で*Neospora caninum*抗体検査を実施した。

成 績

剖検所見：眼球陥没、消瘦、肺の全葉にびまん性の暗赤色化、左心室壁の軽度肥厚および腎臓にびまん性の軽度融解が見られた。その他の臓器に著変は認められなかった。

病理組織学的検査：肺では肺胞腔内に出血が見られ、気管支腔および肺胞腔内に単核細胞の浸潤および、単核細胞の浸潤による肺胞壁の軽度の肥厚が見られた（図1）。また、肺胞壁におけるリンパ濾胞の形成が見られた（図2）。その他の臓器に著変は認められなかった。

免疫組織化学的検査：肺では抗*U. diversum* 2型家兔血清および抗*M. bovis*家兔血清に対する陽性反応は認められなかった。

細菌学的検査：心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、脳、胸腺、胸水、腹水、胃内容物および胎盤から有意な菌は分離されなかった。回腸内容物の大腸菌群数は 4.0×10^2

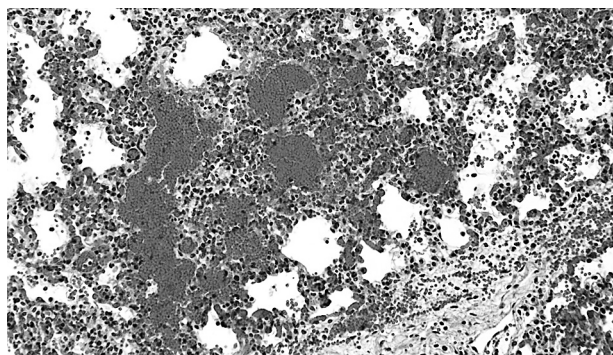


図1. 肺：出血と好中球の浸潤

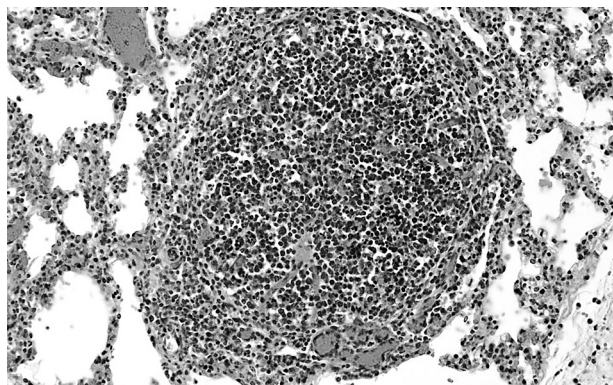


図2. 肺：リンパ濾胞の形成

CFU/gであった。母牛血清のブルセラ症抗体は陰性であった。

マイコプラズマおよびウレアプラズマ検査：肺からマイコプラズマ属菌およびウレアプラズマ属菌は分離されなかった。肺および37℃好気培養実施後の液体培地から、*M. bovis*、*M. bovis genitalium*、*M. dispar*、*M. bovis virrhinis*に特異的な遺伝子は検出されなかったが、肺から*U. diversum*に特異的な遺伝子が検出された。

ウイルス学的検査：心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓および脳でからウイルスは分離されず、牛ウイルス性下痢ウイルスおよび牛伝染性鼻気管炎ウイルスの遺伝子は検出されなかった。直腸内容物からA型ロタウイルス抗原は検出されなかった。

寄生虫学的検査：直腸内容物から*Cryptosporidium parvum*抗原は検出されなかった。母牛の血清から*Neospora caninum*抗体は検出されなかった。

考 察

本事例は病理組織学的検査により出生直後に死亡した子牛の肺にリンパ濾胞の形成が認められたため、マイコプラズマ属菌の関与を疑い、肺を用いて検査を実施したところ、マイコプラズマ属菌およびウレアプラズマ属菌は分離されなかったが、肺から*U. diversum*の遺伝子が

検出されたため、子牛の肺病変には *U. diversum* が関与したと推察された。

本事例の抗 *U. diversum* 2 型家兎血清を用いた免疫組織化学的検査では *U. diversum* 抗原は確認されなかった。*U. diversum* の血清型は野外からの分離株で 3 群からなる 13 種類以上が確認されている^[12]。そのため、本事例には 2 型以外の *U. diversum* が関与した可能性が考えられた。

本事例のように、肺胞壁におけるリンパ濾胞の形成を主徴とする肺炎病変が認められた肺で、ウレアプラズマ属菌分離陰性で、肺での免疫組織化学的検査で抗原が検出されず、遺伝子のみ陽性となる胎齢 8 カ月での死産事例が報告されている^[13]。本事例では *U. diversum* に胎内で感染し、肺に病変が形成されたが、胎内での胎子の死亡には至らず、肺炎が原因で生後間もなく死亡したものと考えられる。すなわち、*U. diversum* による病変形成後の経過が長かったため、*U. diversum* の遺伝子のみが残存したと推察された。

U. diversum は過去の事例でも牛の妊娠後期に異常産を引き起こすと報告されている^[3,13]。当該農場では本事例発生以前にも胎齢 8 カ月前後での異常産が発生していた。過去の異常産にも *U. diversum* が関与している可能性が考えられたが、胎盤や胎子等について詳細な検査は実施しておらず、確定には至らなかった。病性鑑定において、出生直後の死亡や妊娠後期の異常産例では、特に、肉眼的に顕著な異常が認められない場合であっても、*U. diversum* の関与を検討することも必要と考えられた。同様の症例に遭遇した際は遺伝子検査や免疫組織化学的検査を用いた詳細な検査を実施し、検証を継続していく。

今回の事例の免疫組織化学的検査は農研機構 動物衛生研究部門 衛生管理研究領域 病理・生産病グループの木村久美子先生にご協力いただきました。この場をお借りして深く感謝申し上げます。

引用文献

[1] 橋本和典、木嶋真人、中野良宜、四之宮重穂、松村暁：牛の凍結保存精液および子宮膣部粘液からの *Ureaplasma* sp. の分離、家畜衛試研報、82、19-24 (1981)

[2] 天野 弘、根尾規一、土屋 守、柴田昌利、佐野幸男、森 啓明：ウレアプラズマが関与した雌牛の生殖器疾患、日獣会誌、43、252-257 (1990)

[3] JM Diaz, A Prieto, G Lopez, P Diaz, C Lopez, LA Quintela: Association of *Ureaplasma diversum* with

reproductive disease in cattle, NZ Vet J, 67, 249-256 (2019)

[4] D Taylor-Robinson, DA Haig, MH Williams: Bovine T-strain mycoplasma, Ann NY Acad Sci, 143, 517-518 (1967)

[5] Freundt E A: Culture media for classic mycoplasmas, Methods in Mycoplasmaology V1, S Razin Ed, 1st ed, 127-135, Elsevier, Netherlands (1983)

[6] YRS Gonzalez, CR Bascunana, G Bolske, JG Mattsson, CF Molina, K-E Johansson: *In vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR, Vet Microbiol, 47 183-190 (1995)

[7] Kobayashi H, Hirose K, Worarach A, Paugtes P, Ito N, Morozumi T, Yamamoto K: *In vitro* amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovirhinis*, *Mycoplasma alkalescens* and *Mycoplasma bovirgenitalium* by PCR, J Vet Med Sci, 60, 1299-1303 (1998)

[8] 森 康之、西本清仁、大元隆夫、宗田吉広、下地善弘、小林秀樹：牛肺炎からの *Mycoplasma dispar* の検出、日マイコプラズマ会誌、25、78-80 (1998)

[9] Cardoso MV, Blanchard A, Ferris S, Verlengh R, Timenetsky J, Florio Da Cunha RA: Detection of *Ureaplasma diversum* in cattle using a newly developed PCR-based detection assay, Vet Microbiol, 72, 241-250 (2000)

[10] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ: Pestiviruses isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, Arch Virol, 136, 309-323 (1994)

[11] Rocha MA, Barbosa EF, Guimaraes SEF, Neto ED, Gouveia AMG: A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls, Vet Microbiol, 63, 1-11 (1998)

[12] Howard CJ, Gourlay RN, Collins J: Serological studies with bovine Ureaplasmas (T-Mycoplasmas), Int J Syst Evol Bacteriol, 28, 473-477 (1978)

[13] 入部 忠、大石大樹、横山明宏、谷村信彦： *Ureaplasma diversum* が分離、検出された牛異常産 4 症例の病理学的所見、日獣会誌、69、673-677 (2016)