

4 ホルスタイン種子牛で認められたパラポックス感染症

県北家畜保健衛生所

加藤貴誉湖、谷本朱紀

県央家畜保健衛生所

飯塚綾子¹⁾、小島浩一、米山州二

1) 畜産振興課

はじめに

牛丘疹性口炎及び偽牛痘は、それぞれパラポックスウイルス(以下、PPV)属である牛丘疹性口炎ウイルス(以下、BPSV)及び偽牛痘ウイルス(以下、PCPV)の感染により発症する。牛丘疹性口炎は口腔周辺に発赤丘疹を形成し、稀に潰瘍まで進行する¹⁾。また、家畜伝染病予防法(以下、法)で届出伝染病に指定されており、毎年、全国的に発生が報告されている²⁾(図1)。一方、偽牛痘は乳頭、口腔及び口唇部に発赤丘疹、痂皮を形成する¹⁾。偽牛痘は法による届出対象外であるため、発生状況は不明である。

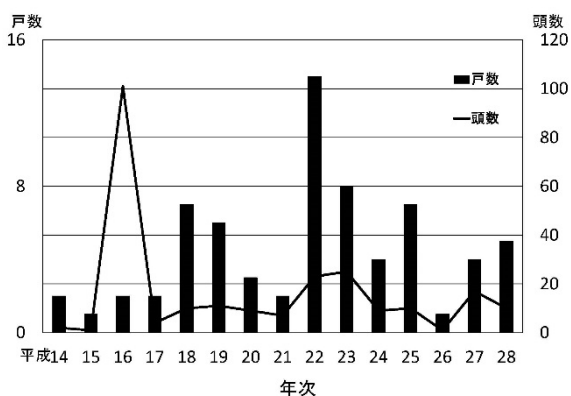


図1 牛丘疹性口炎の発生報告件数

牛丘疹性口炎及び偽牛痘は、口蹄疫と同様に口腔粘膜、鼻腔、乳頭などに病変が観察されることから、平成12年の国内での口蹄疫発生以降、各都道府県で以前に比べ詳細な調査

が進められ、発生が確認されるようになった。

今回、管内で発生した子牛のPPV感染症2症例について、ウイルス学的、病理組織学的に精査したところ、既報とは異なる知見が得られたので、その概要を報告する。

発症牛の概要

【症例①】：育成牛409頭、子牛10頭、繁殖と牛74頭を飼養する預託育成農場の4か月齢のホルスタイン種雌牛で、90日齢で県内酪農家から当該農場に預託された。

【症例②】：肥育牛449頭、育成牛87頭、子牛90頭を飼養する肥育農場の2か月齢のホルスタイン種雄牛で、50日齢で県内酪農家から発生農場に導入された。

発生経過

【症例①】：当該牛は、平成28年12月15日に当該農場に預託され、1か月後の平成29年1月15日、夕方から食欲が減退し、獣医師の診察を受けたところ、発熱はなかったが、肺音がやや粗励であったことから、点滴及び合成抗菌剤の投与が行われ、一時食欲が改善した。しかし、翌1月16日朝、横臥状態となり、点滴及び抗生剤の投与に反応せず、昼頃死亡した。死亡原因の究明のため、獣医師から病性鑑定の依頼があった。

【症例②】：当該牛は、平成29年2月20日に

県内の家畜市場で取引され、取引から農場導入までの3日間、関西地域等の家畜市場へ移動する運搬車両上で飼養されていた。導入から約1週間後の3月2日に下痢及び39.5℃の発熱を呈したため、整腸剤が投与されたが、症状は改善しなかった。更に合成抗菌剤及び補液による治療が実施されたが、症状は全く改善せず、3月14日に元気消失及び食欲不振を呈し、発症から13日後の3月15日未明に死亡した。死亡原因の究明のため、畜主から病性鑑定の依頼があった。

材料と方法

1 材料

当該牛2頭について解剖を実施し、それぞれ肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳、第一胃から第四胃、食道、膵臓、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、大腿筋、上腕筋、脊髄、眼球、胸骨髄、舌、口蓋、副腎、浅頸リンパ節、腸骨下リンパ節、気管、直腸内容物及び気管スワブを採取した。また、上記以外に、症例①では口唇、鼠径リンパ節及び外咽頭リンパ節、症例②では胸腺、膀胱、下顎リンパ節及び空腸内容物を採取し、各種検査に供した。

2 方法

(1) 細菌学的検査

肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳及び気管スワブについて、常法に従い5%羊血液加寒天培地及びDHL寒天培地を用いて好気条件下で37℃、24時間培養した。分離菌の同定にはIDテスト・HN-20ラピッド(日水)を用いた。また、症例②のみ気管スワブについて、マイコプラズマNK液体培地(関東化学)を用いて、好気条件下で37℃、3日間

培養後の培養液をNK寒天培地(関東化学)に接種し、CO₂10%条件下で37℃、3日間培養した。分離された株はPCR法により同定した。更に、直腸内容物について、ハーナテトラチオン酸塩培地及びDHL寒天培地、空腸内容物について、DHL寒天培地及び卵黄加CW寒天培地を用いて好気条件下でそれぞれ培養した。ただし、卵黄加CW寒天培地はアネロパックにより嫌気条件下で培養した。

(2) ウイルス学的検査

ア ウイルス分離

症例①は、口唇及び口蓋部乳剤上清をBT細胞及びBFM細胞、症例②は、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳、舌及び気管乳剤上清をBK細胞、BFM細胞及びMDBK細胞、心残血血清をMDBK-SY細胞にそれぞれ接種し、細胞変性効果(以下、CPE)の有無を確認した。

イ 遺伝子学的検査

症例①は、口蓋部及び口唇部乳剤の上清と沈渣、症例②は、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、脳、舌、気管、心残血血清、胸水及び第三胃パラフィン切片について、PPV³⁾、牛ウイルス性下痢ウイルス(以下、BVDV)、悪性カタル熱ウイルス(以下、MCFV)、ブルータングウイルス、イバラキ病ウイルスを標的としてPCR検査を実施した。ただし、症例①の口蓋部及び口唇部乳剤上清はPPVのみ、症例②の肝臓、脾臓、腎臓、心臓及び肺乳剤はBVDVとMCFVのみ、心残血血清及び胸水はBVDVのみ、第三胃パラフィン切片はPPVのみを標的とした。

また、症例①の口唇部及び口蓋部乳剤上清及び沈渣、症例②の舌乳剤上清を由来とするPCR産物について、*Xmn* I、*Pf1M* I及び*Drd* Iの3種の制限酵素(*Xmn* IはBPSV、*Pf1M*

I は PCPV、*Drd I* は伝染性膿疱性皮膚炎ウイルスの PCR 産物を切断する)処理を行い、切断パターンにより PPV を分類した。

更に、症例①の口唇部及び口蓋部乳剤上清並びに症例②の第三胃パラフィン切片を由来とする PCR 産物について、ダイレクトシーケンス法により塩基配列を決定し、分子系統樹解析を行った。

(3) 病理組織学的検査

採材した材料について 20% 中性緩衝ホルマリンで固定後、定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。また、肺についてはグラム染色及び市販の免疫組織化学的検査キット (ニチレイ) を用いて抗 *Histophilus somni*、抗 *Mannheimia haemolytica*-1、症例①のみ抗 *Pasteurella multocida*-A 抗体による免疫組織化学的検査を実施した。更に、症例①の口唇及び口蓋、症例②の口蓋、口腔粘膜、舌、食道及び第一胃から第三胃について、抗 *Parapoxvirus* 抗体により上記と同様の方法により免疫組織化学的検査を実施した。

結果

1 剖検所見

【症例①】: 口唇及び口蓋に 0.5mm~10mm の丘疹が散見され (図 2 及び図 3)、各リンパ節の腫脹が見られた。また、肺は水腫様で胸膜と癒着し、中葉の背側と後葉の一部を除いて重度の肝変化が観察された (図 4)。

【症例②】: 口腔粘膜、舌、口蓋及び食道で丘疹と一部にびらんが見られた (図 5~7)。また、第一胃から第三胃の粘膜では、白色偽膜様物が付着する丘疹性病変がびまん性に観察された (図 8)。更に、第一胃内には長さ 120cm の

塊化したロープが認められた。胸腔内には黄色く濁った胸水が貯留し、肺は各葉間並びに横隔膜と癒着し、右前葉後部、中葉、後葉及び左前葉後部に肝変化が観察された (図 9)。



図 2 症例①の口唇

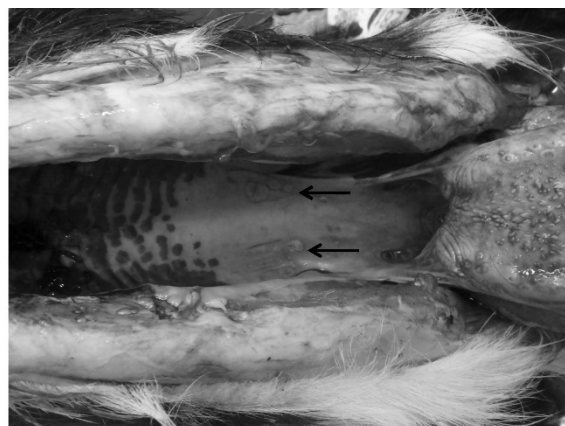


図 3 症例①の口蓋



図 4 症例①の肺



図5 症例②の口腔粘膜及び舌



図8 症例②の第三胃

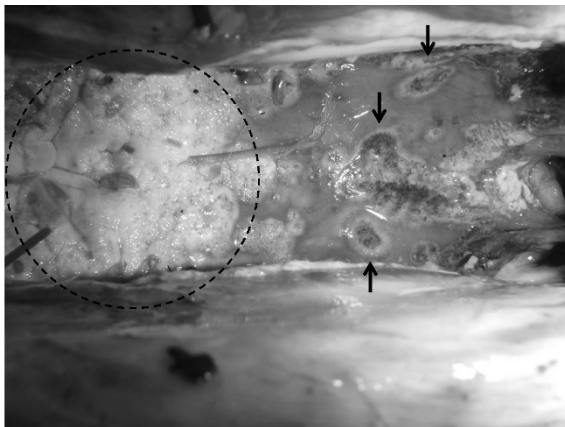


図6 症例②の口蓋



図9 症例②の肺

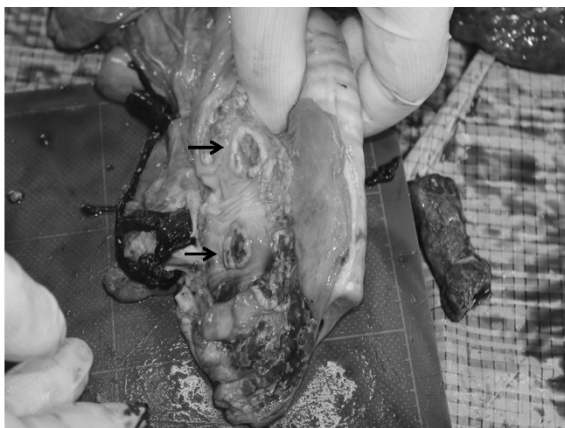


図7 症例②の食道

2 細菌学的検査

【症例①】:いずれの検体からも有意な細菌は分離されなかった。

【症例②】: 肺及び気管スワブから *Mannheimia haemolytica*、気管スワブから *Mycoplasma bovirhinis* が分離された。

3 ウイルス学的検査

【症例①】: 各種材料を接種した培養細胞に CPE は確認されなかった。しかし、PCR 検査では全ての検体から PPV の特異遺伝子が検出され、得られた産物について RFLP を実施したところ、口唇部は *Pf1MI*、口蓋部は *Xmn I* 処理により切断され、異なるパターンを示した。更に、これら産物の塩基配列について分子系

統樹解析を行った結果、口唇部は BPSV、口蓋部は PCPV のクラスターに属し、明確に区別された(図 10)。

【症例②】：各種材料を接種した培養細胞に CPE は確認されなかった。しかし、PCR 検査では、舌乳剤上清及び第三胃パラフィン切片のみから PPV の特異遺伝子が検出され、RFLP では *Pf1MI* 処理により切断された。更に、第三胃パラフィン切片を由来とする PCR 産物の塩基配列について分子系統樹解析を行った結果、PCPV のクラスターに属した(図 10)。

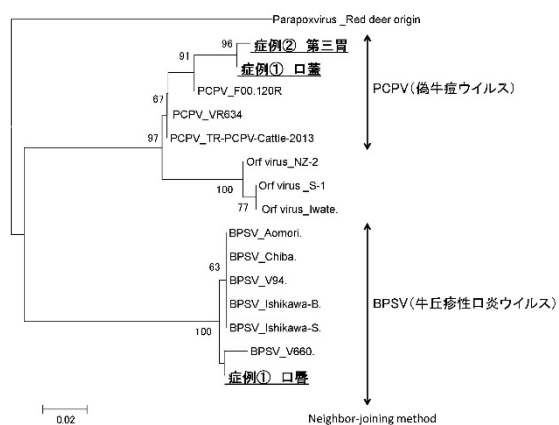


図 10 PPV の分子系統樹解析

4 病理組織学的検査

【症例①】：口唇及び口蓋では上皮が軽度に肥厚し、有棘細胞に風船様変性、好酸性細胞質内封入体が確認され(図 11)、これらの病変部の免疫染色では、*Parapoxvirus* の陽性抗原が検出された。また、第一胃から第三胃でも有棘細胞層に軽度の風船様変性が認められた。一方、肺では大小不同の壊死巣が散見され、壊死巣周囲に燕麦様細胞の集簇、グラム陰性短桿菌の存在及び線維素析出を特徴とする全葉性の線維索性壊死性化膿性胸膜肺炎が認められ、免疫染色では病変部及びグラム陰性短桿菌に一致して、*Histophilus somni* の陽性

抗原が検出された。更に、全身のリンパ系組織において中等度～重度のリンパ球の減少が認められた。

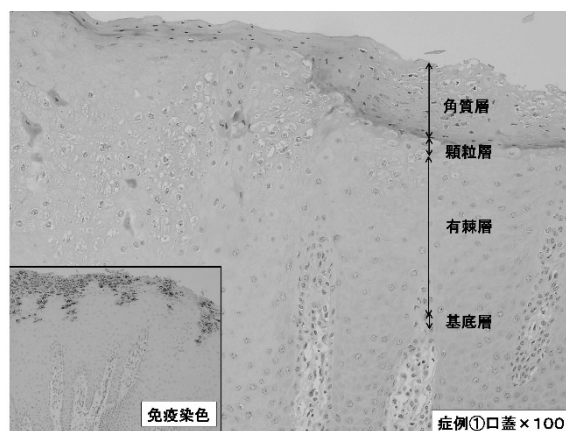


図 11 症例①口蓋の HE 及び免疫染色像

【症例②】：口蓋、口腔粘膜、舌、食道及び第一胃から第三胃において、症例①より重度な上皮の肥厚、有棘細胞の風船様変性及びより高頻度に好酸性細胞質内封入体が観察された(図 12)。また、口蓋、口腔粘膜、舌、食道及び第一胃から第三胃の免疫染色では、病変部において、*Parapoxvirus* の陽性抗原が検出された。更に第三胃では、上皮粘膜が肥厚した部位の電子顕微鏡像で、PPV に特徴的なコーヒー豆様で 250nm×150nm 大のウイルス粒子が確認された(図 13 挿入図)。一方、肺の右前葉後部、右中葉、右後葉、副葉及び左前葉後部では、大小不同の壊死巣が散見され、壊死巣周囲に燕麦様細胞の集簇及びグラム陰性短桿菌の存在を特徴とする壊死性化膿性気管支肺炎が認められ、免疫染色では右中葉と右後葉の病変部及びグラム陰性短桿菌に一致して *Mannheimia haemolytica*-1 の陽性抗原が検出された。更に、胸腺の萎縮及び全身のリンパ系組織において軽度～重度のリンパ球の減少が認められた。

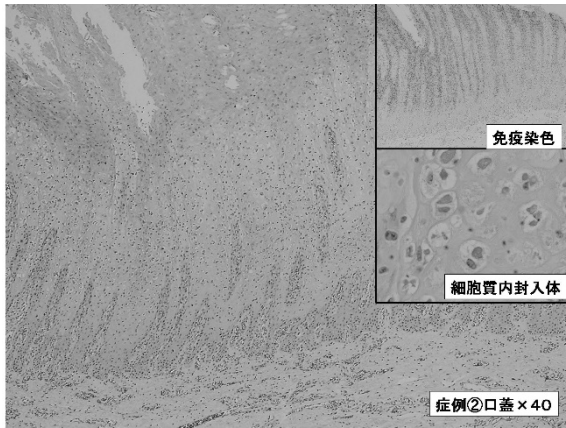


図 12 症例②口蓋 HE 及び免疫染色像

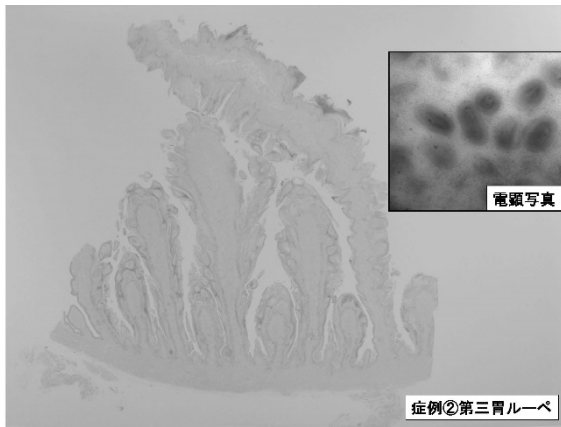


図 13 症例②第三胃ルーペ及び電顕像

考察

症例①は、口唇及び口蓋に丘疹が散見され、丘疹からそれぞれ BPSV 及び PCPV の遺伝子が検出された。また、肺の全葉性に線維索性壊死性化膿性胸膜肺炎が見られ、免疫染色では *Histophilus somni* の陽性抗原が検出された。以上のことから牛丘疹性口炎及び偽牛痘並びにヒストフィルス・ソムニ感染症と診断した。

症例①は、口唇から BPSV、口蓋から PCPV の遺伝子が検出されたが、同一個体の口腔内から 2 種の PPV が検出された報告はなく、非常に珍しい症例であった。

症例②は、口蓋、口腔粘膜、舌及び食道に丘疹の散見及び第一胃から第三胃粘膜に白色

偽膜様物の付着がみられ、丘疹と白色偽膜様物から PCPV の遺伝子が検出された。また、肺では壊死性化膿性気管支肺炎が見られ、肺及び気管スワブから *Mannheimia haemolytica* が分離され、肺の免疫染色で同陽性抗原が検出された。以上のことから偽牛痘及び牛マンヘミア症と診断した。

通常 PCPV の病変は、口腔内や乳房に局限するとされているが、症例②では、口蓋から第三胃にかけて重度の病変が広範囲に認められ、非常に珍しい症例であった。

2 症例の共通点として、発症牛が若齢子牛であること、導入後群飼されて間もないこと、PPV に特徴的な病変が認められたこと、全身性のリンパ球の減少があったこと、死因に深く関与するほど重篤な肺炎を併発していたことがあげられる。これらのことから、2 症例においては、若齢期におけるストレスや肺炎及び免疫能低下等により、病態が悪化したことが引き金となり、PPV が顕在化して消化器官に症状を現したものと考えられた。

一方、症例①では、同一個体の口腔内に 2 種の PPV が感染していたことから、PPV 感染症を疑う際には、複数の病変部を採材する必要があると思われた。また、症例②において、PCPV であっても第一胃から第三胃に至る広範囲な病変を起こした要因として、ウイルスの病原性や宿主の免疫力の違いが考えられたが、今回の検査成績のみでは言及できず、症例数の蓄積等が必要と思われた。

PPV 感染症は、今回の 2 症例のように肉眼所見のみで PCPV と BSPV を判別することは非常に困難であり、PPV 感染症の正確な診断のためには、解剖時に病変部を広範囲に採取することが必要であり、遺伝学的解析が必須であることを再認識した。

最後に、本発表に御協力をいただいた農研機構動物衛生研究部門の諸先生方並びに県農業試験場生物工学研究室の各位に深謝する。

参考文献

- 1) 動物の感染症. 第二版. 近代出版. 118-119
- 2) 農林水産省ホームページ「監視伝染病の発生状況」より集計
- 3) Inoshima Y, Morooka A, Sentsui H :
Detection and diagnosis of parapoxvirus by
the polymerase chain reaction, *J Virol
Methods*, 84, 201-208 (2000)