

Ureaplasma diversum が分離, 検出された 牛異常産 4 症例の病理学的所見

入部 忠^{1)†} 大石大樹²⁾ 横山明宏²⁾ 谷村信彦³⁾

- 1) 山口県西部家畜保健衛生所 (〒750-0421 下関市豊田町殿敷 1892)
 2) 山口県中部家畜保健衛生所 (〒754-0897 山口市嘉川 671-5)
 3) 国研農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2016年5月9日受付・2016年7月11日受理)

要 約

山口県で発生した黒毛和種及び無角和種の異常産 4 症例の胎子から *Ureaplasma diversum* が分離, 検出され, すべての症例において病理組織学的に肺炎病変が確認された。肺炎病変では, 肺胞中隔, 細気管支周囲等の間質にリンパ球を主体とした単核細胞の浸潤が共通して認められ, 浸潤細胞による肺胞中隔の肥厚, リンパ球の集簇及び濾胞の形成が確認された。胎盤が採材された症例 1 では, 間質における水腫, 単核細胞の浸潤, 動脈炎, 血栓形成, 絨毛上皮細胞の壊死脱落が胎盤で認められた。*U. diversum* の検出において遺伝子検査の感度は菌分離よりも高かった。また, 肺乳剤を用いた PCR で陰性の症例においても, 病変部位のパラフィン切片を用いた PCR で陽性が確認された。これらのことから, *U. diversum* が胎子の肺及び胎盤に病変を形成することで, 肉用牛の異常産を引き起こしている可能性が示唆された。——キーワード: 牛異常産, 間質性肺炎, *Ureaplasma diversum*。

-----日獣会誌 69, 673~677 (2016)

Ureaplasma diversum は, *Mycoplasma* 科 *Ureaplasma* 属に属する牛の肺炎や生殖器疾患等の起因为菌で [1], 臨床症状を伴わない牛の肺や泌乳生殖器からも分離されることが報告されている [2]。国内では *U. diversum* が関連した子牛の肺炎, 泌乳生殖器疾患等の報告が認められるものの, 流死産等の異常産に関する報告はわずかである [3]。今回, *U. diversum* が分離, 検出された山口県の肉用牛における異常産 4 症例の病性鑑定をととして一定の知見が得られたため, 概要を報告する。

材料及び方法

材料: 1999年9月~2015年5月に肉用牛の異常産 4 症例 (表 1) について, 胎子の各種臓器, また, 症例に応じて胎盤, 母牛の膣スワブが採材された。

病理学的検査: 病理解剖学的検査実施後, 定法に基づき諸臓器の薄切切片を作製し, ヘマトキシリン・エオジン染色を実施した。

免疫組織化学的染色検査 (免染): 症例 2 の肺を用いて抗 *U. diversum* 2 型家兎血清 (農研機構動物衛生研究部門) を一次抗体に用いた酵素抗体法により実施した。組織切片は 0.1% アクチナーゼ処理 (37°C, 5 分) により抗原の賦活化を実施後, 3% H₂O₂ 含有メタノール (室

表 1 異常産症例の概要

症例	発生年月日	畜種	異常産の内容	胎齢	性別	産歴
1	1999/9/17	無角和種	死産	251	雌	不明 (母牛 1987 年生まれ)
2	2013/4/1	黒毛和種	早産→直後に死亡	261	雄	2 産目
3	2014/12/8	無角和種	死産	241	雌	4 産目
4	2015/5/18	黒毛和種	死産	246	雄	1 産目

† 連絡責任者: 入部 忠 (山口県西部家畜保健衛生所)

〒750-0421 下関市豊田町殿敷 1892

☎ 083-766-1018 FAX 083-766-0239

E-mail: iribe.tadashi@pref.yamaguchi.lg.jp

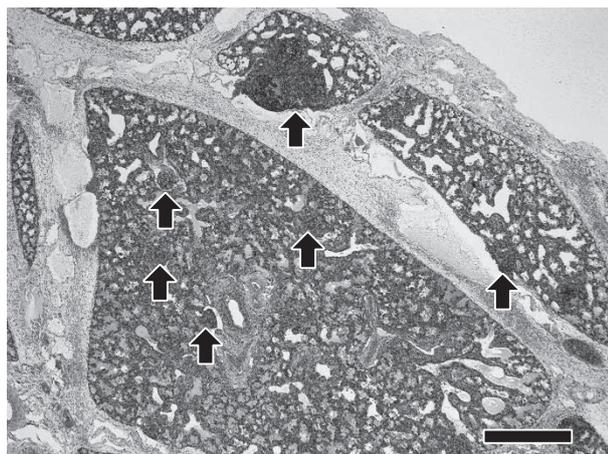


図1 肺炎病変 (症例2)

小葉間は出血, 水腫により拡張している. 散発性にリンパ球の巣状浸潤が認められる (矢印).

(Bar=500 μ m)

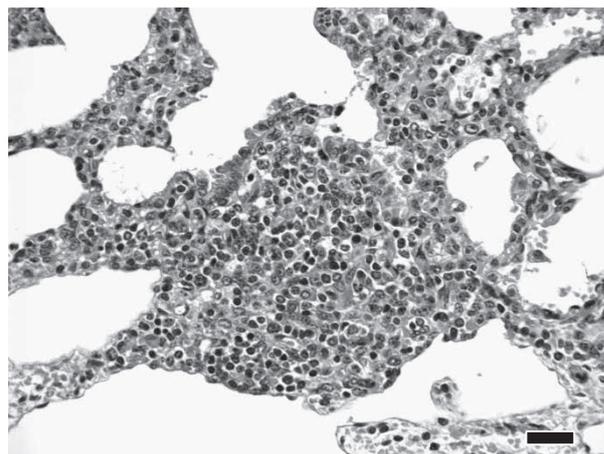


図2 肺炎病変 (症例2)

リンパ球主体の細胞浸潤, リンパ球の巣状浸潤により肥厚した肺胞中隔が認められる. (Bar=50 μ m)

温, 30分) により内因性ペルオキシダーゼの不活化を行った. 一次抗体処理には8,192倍に希釈した前述の抗体を用いた (室温, 30分). 一次抗体処理後の組織切片について, 二次抗体 (シンプルステイン MAX-PO (MULTI), ㈱ニチレイ, 東京) 及び発色処理 (シンプルステイン DAB 溶液, ㈱ニチレイ, 東京) を各種キットの使用法に従って実施した. 切片はヘマトキシリンで対比染色後, 鏡検を実施した. 陽性コントロールには, 正常牛肝臓に同症例由来の *U. diversum* 菌液を注入後ホルマリン固定し作製した切片を用いた.

透過型電子顕微鏡検査 (電顕): ホルマリン固定済みの症例2の肺をオスミウム酸固定, エポキシ樹脂包埋後に超薄切切片を作製し, 酢酸ウラン・酢酸鉛染色後, 透過型電子顕微鏡 (日立 H-7500, ㈱日立ハイテクノロジー, 東京) を用いて観察した.

一般細菌検査: 主要臓器等を用いて5%羊血液加寒天培地, DHL寒天培地, 5%卵黄加 GAM寒天培地に直接塗抹し, それぞれ37 $^{\circ}$ C 24~72時間5% CO₂培養, 好気培養及び嫌気培養を実施した.

Mycoplasma 検査: 10% (w/v) 肺乳剤及び膈スワブを材料に *Mycoplasma* NK培地, Hayflick培地, GS寒天培地, Taylor-Robinson培地を用いて, 10倍段階希釈及び37 $^{\circ}$ C好気培養を実施し, 増殖が確認された培地について同寒天培地を用いて純分離を実施した (症例1~3). 菌種同定は, コロニーのGram染色性, 形態, 発育性, 生化学性状及び抗 *Ureaplasma* 血清を用いた発育阻止試験 (症例1), もしくは遺伝子検査 (症例2, 3) により行った. 遺伝子検査では, 市販キットを用いて分離株, 肺 (症例2~4) 及び胎盤 (症例4) の乳剤, 母牛の膈スワブ (症例2) (High Pure Viral Nucleic Acid Kit, ロシュ・ダイアグノスティックス㈱, 東京), 肺のパラ

フィン切片 (症例3) (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, ㈱キアゲン, 東京) からDNAを抽出し, *U. diversum* (症例2~4), *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis* 及び *M. bovis genitalium* (症例2) に特異的なPCRを実施した [4-7].

ウイルス学的検査: 主要臓器, 中枢神経を材料にしたウイルス分離 (MDBK-SY, VeriT, HmLu-1細胞), 同材料から市販キット (High Pure Viral RNA Kit, ロシュ・ダイアグノスティックス㈱, 東京) を用いて抽出したRNAを用いた遺伝子検査 (シンプ血清群ウイルス, パリアム血清群ウイルス, EHD血清群ウイルス, ブルータングウイルス [8], 牛ウイルス性下痢ウイルス [9], 牛パラインフルエンザウイルス3型 [10]), 胎子もしくは母牛血清を用いた血清学的検査 (中和試験: アカバナウイルス, アイノウイルス, チュウザンウイルス, イバラキウイルス, ピートンウイルス, サシユベリウイルス, ディアギュラウイルス, 牛ヘルペスウイルス1型, 牛RSウイルス, 牛流行熱ウイルス, BVDV, BPIV-3, ゲル内沈降反応: ブルータングウイルス) を症例に応じて実施した.

成 績

病理学的検査: 病理解剖学的に症例2の体格は小さく, 心嚢水, 腹水の貯留, 肝臓, 肺における水腫様変化, 症例3では脊柱のS字状彎曲がみられた. 症例1と4では胎子, 胎盤に著変はみられなかった. 病理組織学的検査では, いずれの症例においても肺炎病変が認められた. 共通所見として肺胞中隔, 細気管支周囲, 小葉間結合組織等の間質にリンパ球を主体とした単核細胞の浸潤が認められた. 多くの症例では肺胞中隔にリンパ球の巣状浸潤がみられ, 症例2と3ではリンパ濾胞の形成が確認された. また, 肺胞中隔はうっ血, 単核細胞の浸潤等

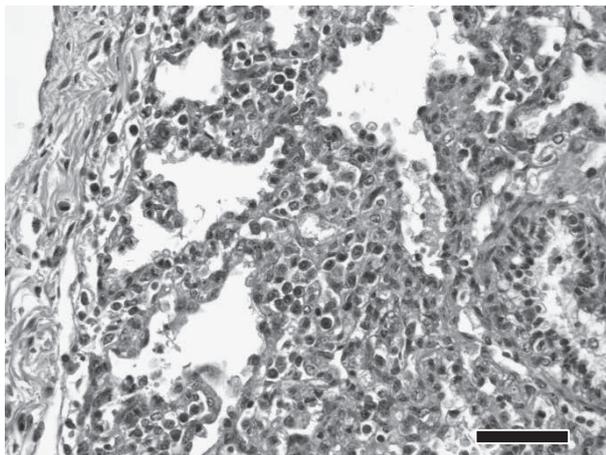


図3 肺炎病変 (症例3)
リンパ球主体の細胞浸潤により肥厚した肺胞中隔が認められる。(Bar=50μm)

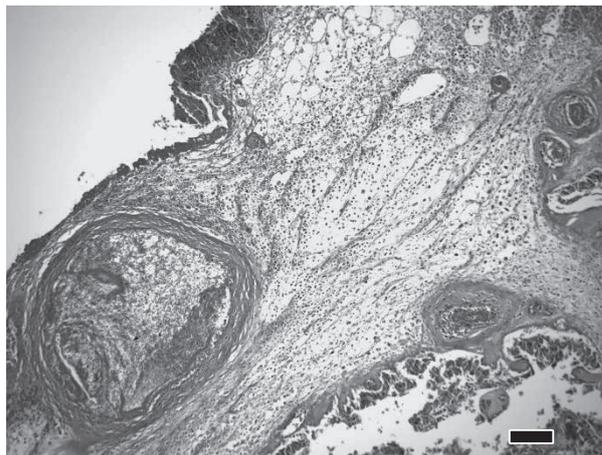


図4 胎盤病変 (症例1)
間質における水腫, 単核細胞の浸潤, 動脈炎, 絨毛上皮細胞の壊死脱落が認められる。(Bar=100μm)

に伴い軽度から中程度拡張していた。肺胞腔にはすべての症例で軽度好中球、マクロファージの浸潤がみられ、羊水由来と推察される構造物が散見された。症例2では小葉間結合組織及び肺胞腔に水腫、出血がみられ、小葉間結合組織の拡張が認められた(図1~3)。病理学的検査に唯一供試された症例1の胎盤では、間質における水腫、単核細胞の浸潤、動脈壁における水腫及び炎症細胞の浸潤、血栓形成、絨毛上皮細胞の壊死脱落がみられ(図4)、症例2と4ではび慢性の肝細胞の空胞変性、症例2と3の胸腺ではリンパ球核濃縮による星空像がみられた。

免疫: 陽性コントロールでは菌体に一致した陽性反応が確認されたが、症例2では陽性抗原は認められなかった。

電顕: 症例2の細気管支及び肺胞の上皮細胞表層に *Ureaplasma* 様の構造物は確認されなかった。

一般細菌検査: いずれの症例においても有意な菌は分離されなかった。

Mycoplasma 検査: 成績は表2のとおりであった。いずれも胎子の肺から *U. diversum* が分離もしくは検出された。また、母牛の膣スワブ(症例1, 2)と胎盤(症例4)が採材された症例ではいずれも同菌が分離もしくは検出された。症例2の膣スワブは分離陰性、遺伝子検査陽性であった。

ウイルス学的検査: いずれの症例においてもウイルスの関与は確認されなかった。

考 察

国内における *Ureaplasma* が関与した牛異常産の報告は大変少ないが、今回、肉用牛の異常産4症例で *U. diversum* が分離、検出された。これらの症例における *Mycoplasma* の関与については、PCRと分離成績の

表2 *Mycoplasma* 検査結果

症例	<i>Ureaplasma diversum</i> の分離成績 (ccu ¹⁾ /g)	PCR	
		<i>U. diversum</i>	<i>Mycoplasma</i> ²⁾
1	肺: 10 ⁵ ccu/g, 母牛膣スワブ: 10 ⁶ ccu/g	NT ³⁾	NT
2	肺: 10 ³ ccu/g, 母牛膣スワブ: 陰性	肺(乳剤), 母牛膣スワブ: 陽性	陰性
3	陰性	肺(乳剤): 陰性, 肺(パラフィン切片): 陽性	NT
4	NT	肺, 胎盤(乳剤): 陽性	NT

1) ccu: color changing unit

2) *Mycoplasma*: *Mycoplasma bovis*, *M. dispar*, *M. bovirhinis*, *M. bovigenitalium*

3) NT: 検査未実施

結果から可能性が低いものと考えられた。いずれの症例も肉用牛(黒毛和種, 無角和種), 妊娠後期(胎齢241~261日)における発生であった。症例1と3は同一農場であるものの、各症例の発生時期と地域の疫学的関連は低く、どの症例も単発事例と考えられた。病理学的検査では、全症例の肺間質にリンパ球主体の単核細胞浸潤が認められた。海外では *U. diversum* の野外及び実験感染例で類似した肺炎病変が報告されているが[11-13], 国内で飼養されている肉用牛においても同様の所見が得られることが確認されたことになる。国内では、*U. diversum* が分離されたホルスタイン種の流産胎子の肺に小動脈炎, 胎盤絨毛膜に単核細胞浸潤及び小動脈炎がみられたと報告されているが、肺炎病変は確認されておらず[3], 病変ステージもしくは胎齢等の宿主側の要因による影響と推察された。*Mycoplasma* による肺炎病変形成には宿主の免疫応答が大きく関与していると考えられており[14], マウスにおける *U. diversum* の実験

感染でもサイトカインの誘導が確認され, リンパ球, マクロファージの活性化を引き起こす可能性が示唆されていることから [15], 今回の症例も *M. dispar* 等の慢性型でみられるリンパ装置の過形成と類似した機序により病変が形成されている可能性が考えられた. 症例 2 の感染では *U. diversum* 抗原が確認できず, 肺炎病変形成に対する本菌の関与を病理学的に確認することはできなかった. あわせて実施した電顕観察においても *U. diversum* 様の構造物は認められなかったが, ごく一部の範囲しか観察されていないこと, 採材時点と感染因子の増殖が一致しているとは限らないことから, *U. diversum* の関与を否定するものではないと考えられた. これに対して遺伝子検査の感度は高く, 実施した症例ではいずれも陽性であり, 症例 3 では肺乳剤を用いた分離及び遺伝子検査は陰性であったものの病変部位のパラフィン切片を用いた遺伝子検査が陽性であったことから, 遺伝子検査の感度の高さを示すとともに病変部位に *U. diversum* が局在している可能性が示唆された. また, *U. diversum* は本症例の母牛の陰, 胎盤で検出されており, これらを経由して上行性もしくは経胎盤性に感染した可能性が示唆された.

牛異常産の原因は多岐にわたり究明に至らないことも多いが, 妊娠後期の異常産において病理学的に上記と同様の肺炎病変, または胎盤病変がみられた場合, 特に *U. diversum* の関与を疑い, 病変部位を用いた遺伝子検査を主体に検査を行うことで原因究明に至る可能性がある. 今後は組織切片上で *Ureaplasma* の局在を明らかにし, 異常産の発生機序を解明することが重要と考えられた.

本研究の感染についてご助言いただいた農研機構動物衛生研究部門 播谷 亮上席研究員に深謝する.

引用文献

- [1] Kreplin CM, Ruhnke HL, Miller RB, Doig PA : The effect of intrauterine inoculation with *Ureaplasma diversum* on bovine fertility, *Can J Vet Res*, 51, 440-443 (1987)
- [2] 天野 弘, 梶尾規一, 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] 坂田健一, 宮崎 大, 吉川恵郷, 八重樫岳司, 浅野 隆 : *Ureaplasma diversum* が分離された牛の流産例, *獣医畜産新報*, 55, 97-99 (2002)
- [4] Vasconcellos Cardoso M, Blanchard A, Ferris S, Verlengia 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)
- [5] Chávez González YR, Ros Bascañana C, Bölske G, Mattsson JG, Fernández Molina C, Johansson KE : In vitro amplification of the 16S rRNA genes from *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma agalactiae* by PCR, *Vet Microbiol*, 47, 183-190 (1995)
- [6] 森 康行, 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, *日本マイコプラズマ学会雑誌*, 25, 78-80 (1998)
- [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 bovigenitalium* by PCR, *J Vet Med Sci*, 60, 1299-1303 (1998)
- [8] Ohashi S, Yoshida K, Yanase T, Kato T, Tsuda T : Simultaneous detection of bovine arboviruses using single-tube multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction, *J Virol Methods*, 120, 79-85 (2004)
- [9] 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)
- [10] Konishi M, Ohkura T, Shimizu M, Akiyama M, Kameyama K, Takeuchi K : Complete Genome Sequence of the First Isolate of Genotype C Bovine Parainfluenza Virus Type 3 in Japan, *Genome Announc*, 2, e01215-1214(2014), (online), (<http://genomea.asm.org/content/2/6/e01215-1214.full.pdf>), (published 2014-11-26)
- [11] Ruhnke HL, Palmer NC, Doig PA, Miller RB : Bovine abortion and neonatal death associated with *Ureaplasma diversum*, *Theriogenology*, 21, 295-301 (1984)
- [12] Miller RB, Ruhnke HL, Doig PA, Poitras BJ, Palmer NC : The effects of *Ureaplasma diversum* inoculated into the amniotic cavity in cows, *Theriogenology*, 20, 367-374 (1983)
- [13] Kreplin CM, Maitland VF : Alberta. Abortion due to *Ureaplasma diversum*, *Can Vet J*, 30, 435 (1989)
- [14] 平井義一 : マイコプラズマ, 標準微生物学, 山西弘一監修, 第9版, 308-314, 医学書院, 東京 (2005)
- [15] Chelmonska-Soyta A, Miller RB, Ruhnke L, Rosendal S : Activation of murine macrophages and lymphocytes by *Ureaplasma diversum*, *Can J Vet Res*, 58, 275-280 (1994)

Pathological Findings in Four Aborted Bovine Fetuses with Isolation or Detection
of *Ureaplasma diversum*

Tadashi IRIBE^{1)†}, Daiki OHISHI²⁾, Akihiro YOKOYAMA²⁾ and Nobuhiko TANIMURA³⁾

- 1) *Yamaguchi Seibu Livestock Health and Hygiene Service Center, 1892 Tonoshiki, Toyotachou, Shimonoseki 750-0421, Japan*
- 2) *Yamaguchi Chubu Livestock Health and Hygiene Service Center, 671-5 Kagawa, Yamaguchi, 754-0897, Japan*
- 3) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Reserch Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

Ureaplasma diversum was isolated or detected in four cases of Japanese Black and Japanese Polled aborted fetuses in Yamaguchi prefecture. In all cases pneumonic lesions were histopathologically confirmed. Pneumonic lesions had mononuclear cell infiltration mainly consisting of lymphocytes, which had characteristic nodules and follicles. In the placenta of Case 1 interstitial edema, mononuclear cell infiltration, arteritis with thrombus formation, and chorionic epithelial necrosis were present. In regard to the sensitivity of detection for *U. diversum*, the genetic test was more effective than cultivation. PCR using DNA that was extracted from paraffin-embedded lesion tissue showed a positive reaction regardless of the PCR negative when using organ emulsion. These results suggest the possibility that pneumonia and fetal placental lesions were caused by *U. diversum* and were related to the Japanese beef cattle abortions.

— Key words : bovine abortion, interstitial pneumonia, *Ureaplasma diversum*.

† Correspondence to : Tadashi IRIBE (*Yamaguchi Seibu Livestock Health and Hygiene Service Center*)

1892 Tonoshiki, Toyotachou, Shimonoseki 750-0421, Japan

TEL 083-766-1018 FAX 083-766-0239 E-mail : iribe.tadashi@pref.yamaguchi.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 69, 673 ~ 677 (2016)