

Candida albicans による子牛の真菌性前胃炎瀧澤光華^{1)†} 水野剛志²⁾ 中原真琴¹⁾ 松浦俊幸¹⁾ 今井直人³⁾Tilusha Manchanayake⁴⁾ 花房泰子⁵⁾ 芝原友幸⁵⁾

- 1) 群馬県家畜衛生研究所 (〒371-0103 前橋市富士見町小暮 2425-3)
- 2) 群馬県中部農業事務所家畜保健衛生課 (〒379-2165 前橋市上長磯町 315)
- 3) 福島県県中家畜保健衛生所 (〒963-8031 郡山市富田町字満水田 2)
- 4) *Division of Pathology, Veterinary Research Institute, Gannoruwa, Peradeniya, 20400, Sri Lanka*
- 5) 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10月12日受付・2016年12月15日受理)

要 約

群馬県内の黒毛和種牛飼養農家で、86日齢の子牛が下痢を呈して死亡した。剖検では、第一胃、第二胃及び第三胃粘膜に白黄色偽膜様物の付着がみられた。組織学的に、第一胃、第二胃及び第三胃の粘膜上皮は好中球の重度浸潤、錯角化及び角化亢進により著しく肥厚していた。病変部には多数の酵母様真菌と仮性菌糸を認めた。真菌の形態、抗真菌抗体を用いた免疫組織化学的染色並びに第一胃、第二胃及び第三胃のパラフィン切片より抽出したDNAを用いた分子生物学的解析の結果より、本真菌は*Candida albicans*と同定され、本症例は*C. albicans*による子牛の真菌性前胃炎と診断された。——キーワード：子牛、*Candida albicans*、前胃。

-----日獣会誌 70, 219~223 (2017)

Candida 属真菌はヒトや多くの動物の皮膚、消化管及び生殖器における常在性の酵母様真菌で、カンジダ症は*Candida* 属真菌による日和見感染症として知られている [1, 2].

真菌性胃炎の原因の一つとして、カンジダ症は古くから報告があるが、牛における報告は少ない [3, 4]. *Candida albicans* による牛の前胃炎は、Crossら [3] により1970年に報告されているが、原因真菌の同定は病理組織学的検査と真菌学的検査のみにより行われており、分子生物学的解析は実施されていない。しかしながら、近年では分子生物学的解析による真菌の同定が一般的になりつつある [5].

今回、下痢を呈して死亡した86日齢の黒毛和種子牛において第一胃、第二胃及び第三胃に真菌性胃炎がみられた。真菌の形態、抗真菌抗体を用いた免疫組織化学的染色並びに第一胃、第二胃及び第三胃のパラフィン切片より抽出したDNAを用いた分子生物学的解析により

C. albicans が病変形成に関与したと考えられたので、その概要を報告する。

材料及び方法

発生状況と材料：群馬県内の繁殖雌牛24頭規模の黒毛和種牛生産農家において、2015年10月23日生まれの黒毛和種雄子牛が、10月28日、11月5日、2016年1月3日及び1月13日に下痢を呈し、それぞれ抗生物質や補液、消炎剤等の治療を受けたが1月17日に斃死した。抗生物質は、10月28日から3日間、ベンジルペニシリンプロカインと硫酸ジヒドロストレプトマイシンの複合抗生物質製剤（ベンジルペニシリンプロカイン60万単位、硫酸ジヒドロストレプトマイシン750mg）が投与されていた。11月5日からはエンロフロキサシン250mgが3日間投与された後、フロルフェニコール600mgが3日間投与されていた。1月3日からはフロルフェニコール600mgが5日間、1月13日からはカナ

† 連絡責任者：瀧澤光華（群馬県家畜衛生研究所）

〒371-0103 前橋市富士見町小暮 2425-3

☎ 027-288-2106 FAX 027-288-2161

E-mail : taki-ko@pref.gunma.lg.jp

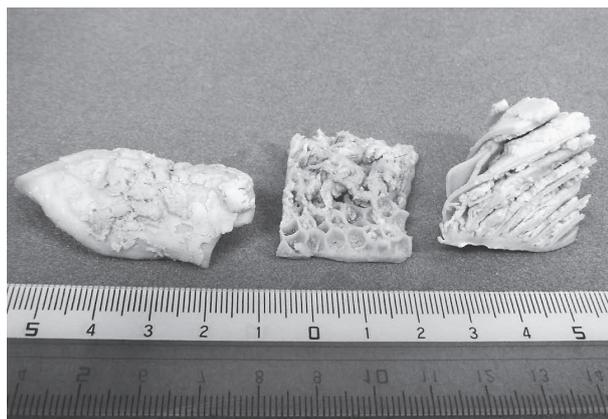


図1 第一胃，第二胃及び第三胃の肉眼写真
粘膜に白黄色偽膜様物の付着がみられる。

マイシン 600mg が3日間投与された。

病理学的検査：剖検後，主要臓器を10%中性緩衝ホルマリンで固定し，定法に従いパラフィン包埋，薄切後，切片を作製しヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行った。主要臓器については過ヨウ素酸シッフ（PAS）反応及びグロコット染色を行った。第一胃，第二胃，第三胃及び肺についてはグラム染色を実施した。

免疫組織化学的検査：第一胃，第二胃，第三胃及び盲腸のパラフィン切片を用い，免疫組織化学的染色を実施した。一次抗体は抗 *C. albicans* 家兎抗体（2,048倍希釈，Biogenesis, U.K.），抗 *Aspergillus fumigatus* モノクロナル抗体（1,024倍希釈，Dako, U.S.A.）及び抗 *Rhizomucor arrhizus* モノクロナル抗体（258倍希釈，Dako, U.S.A.）並びに各一次抗体希釈液は市販抗体希釈液（S3022, Dako, U.S.A.）を用い，市販キット（ヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI) キット，(株)ニチレイ，東京）の手順に従って実施した [6]。

分子生物学的菌種同定：真菌の分子生物学的同定には，既報 [7] と同様の手法を用いた。第一胃，第二胃及び第三胃のパラフィン切片から市販抽出剤（Takara DEXPAT，タカラバイオ(株)，滋賀）を用いてDNAを抽出し，プライマー-Internal transcribed spacer (ITS) 3及びITS4を用いたPCR [8] によりITS領域中の5.8S-ITS2 rDNA領域を増幅した。得られたPCR産物について，同一プライマーを用いたダイレクトシーケンスを行った。得られた塩基配列について National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を利用しBLASTによる相同性検索を行った。

細菌学的検査：主要臓器を5%羊血液加寒天培地及びDHL寒天培地（以上，日本ベクトン・ディッキンソン(株)，東京）を用いて5%炭酸ガス下及び好気下で37°C 18時間培養した。

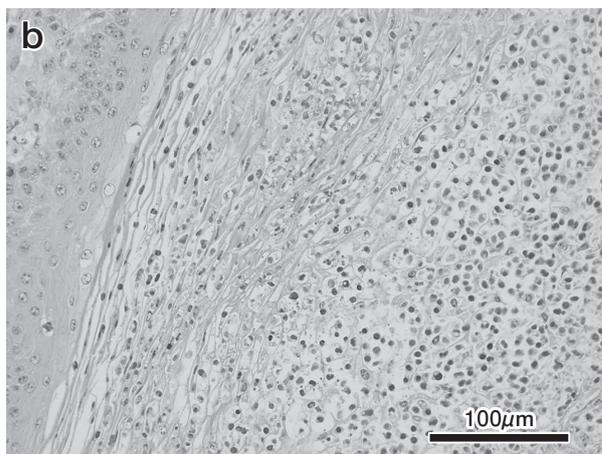
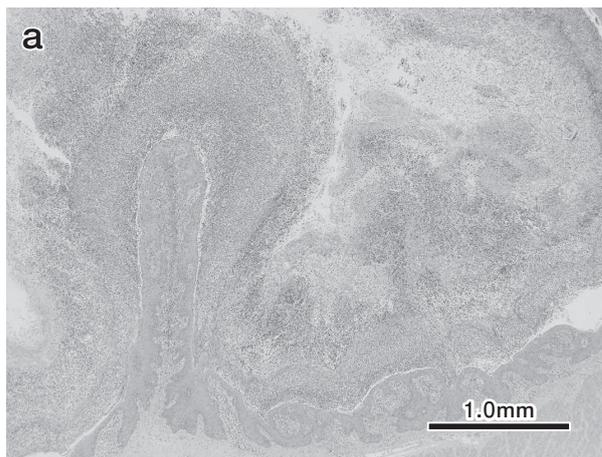


図2 第二胃

a：粘膜は著しく肥厚している（HE染色 Bar=1mm）。

b：肥厚した粘膜上皮では好中球の重度浸潤，錯角化や角化亢進が認められる（HE染色 Bar=100µm）。

ウイルス学的検査：肺乳剤を用いて牛RSウイルス（BRSV）及び牛パラインフルエンザウイルス3型（BPV-3）（Kirisawa R, et al : Detection of bovine parainfluenza virus type 3, bovine respiratory syncytial virus and bovine viral diarrhea mucosal disease virus infections by polymerase chain reactions, J Rakuno Gakuen Univ, 19, 225-237 (1994)），また，腎乳剤を用いて牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV） [9] の遺伝子検索を行った。

結 果

病理解剖所見：当該子牛は発育不良を呈していた。第一胃，第二胃及び第三胃の粘膜には白黄色偽膜様物の付着がみられた（図1）。第一胃は毛球と紐状の異物をいていた。肺は両後葉を除き暗赤色を呈し硬度を増していた。副葉に大豆大の乾酪膿瘍がみられた。その他の臓器に著変は認められなかった。

病理組織学的所見：第一胃，第二胃及び第三胃の粘膜上皮は好中球の重度浸潤，錯角化及び角化亢進により著

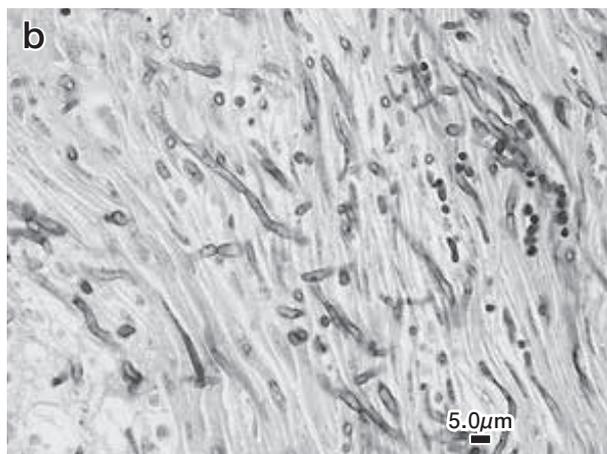
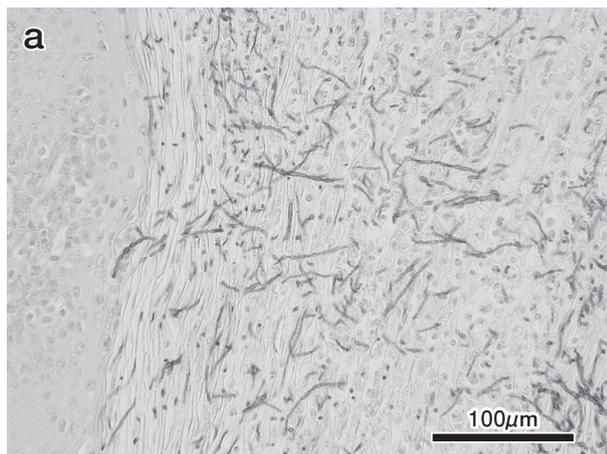


図3 第三胃

- a : 肥厚した角質層では多数の真菌が認められる (PAS 反応 Bar=100µm).
- b : 酵母様真菌と幅3~5µm でくびれを有する仮性菌糸 (PAS 反応 Bar=5µm).

しく肥厚していた (図2a, 図2b). 粘膜表層にはさまざまな菌がみられたが, PAS 反応とグロコット染色により, 肥厚した粘膜上皮において直径3~4µm の球形から卵円形の酵母様真菌と幅3~5µm でくびれを有する仮性菌糸を認めた (図3a, 図3b). 粘膜表層では酵母様真菌が, 粘膜深層では仮性菌糸が優位に認められた. 盲腸では, 粘膜に小さい壊死が散見され, 壊死部には, 前胃病変部と同様の菌体が見られた. その他, 肺の副葉にグラム陰性小桿菌塊と燕麦細胞 (好中球が外毒素により変性したものとされる紡錘状の変性細胞) の出現を伴う被包化膿瘍, 回腸パイエル板のリンパ球減少, 十二指腸, 空腸及び盲腸に陰窩膿瘍がみられた.

免疫組織化学的所見: 第一胃, 第二胃, 第三胃及び盲腸に認められた真菌は抗 *C. albicans* 家兎抗体を用いた免疫染色で陽性反応を示し (図4), 抗 *A. fumigatus* 及び抗 *R. arrhizus* 抗体では陰性を示した.

分子生物学的菌種同定: 第一胃と第二胃及び第三胃のパラフィン切片から抽出したDNAを用いたPCR及び

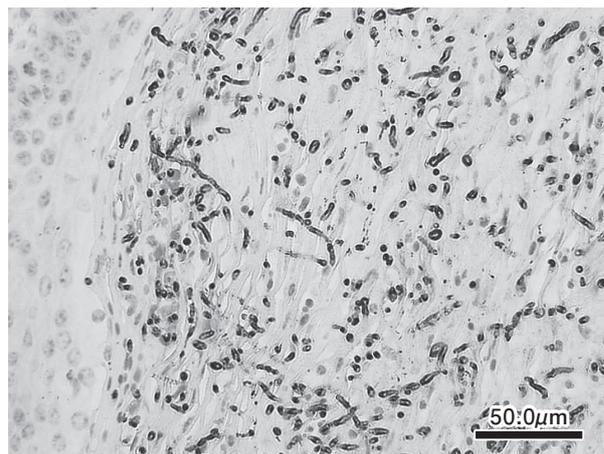


図4 第三胃

真菌は抗 *Candida albicans* 家兎抗体に陽性反応を示す (免疫染色 Bar=50µm).

ダイレクトシーケンスにより得られた302bpの塩基配列 (Accession No. LC189477) をBLAST解析したところ, 既知の *C. albicans* 当該領域塩基配列と100%の相同性を示した.

細菌学的検査: 細菌培養では, いずれの臓器からも有意菌は分離されなかった.

ウイルス学的検査: 肺乳剤からBRSV及びBPIV-3, また, 腎乳剤からBVDVの特異遺伝子は検出されなかった.

考 察

下痢を呈し死亡した黒毛和種子牛の第一胃, 第二胃及び第三胃に重度の真菌性前胃炎がみられた. 病理学的検索及び第一胃, 第二胃及び第三胃のパラフィン切片より抽出したDNAを用いた分子生物学的解析の結果から本真菌を *C. albicans* と同定した.

病理組織学的検査により本症例の病変部に酵母様真菌と幅3~5µmの仮性菌糸がみられた. これらは菌糸性発育のみ見られない *Candida glabrata* を除く多くの *Candida* 属真菌の組織内形態と一致していた [10]. また, 粘膜表層では酵母様真菌が, 粘膜深層では仮性菌糸が多く認められたが, *Candida* 属真菌は宿主粘膜上皮に常在菌として定着しているときは酵母状であり, 病変部では菌糸状に変化して発育する [11, 12]. 本症例でみられた *C. albicans* の形態と菌体が第一胃から第三胃の肥厚した粘膜にみられた点は, 過去の報告と非常に類似していた [3]. また, 本症例では盲腸にも *Candida* 属真菌による病変が認められたが, 病変は粘膜において散在性に見られたことから, 前胃病変から消化管を経由した *C. albicans* により二次的に形成されたと考えられた.

牛の *C. albicans* による前胃炎は1970年にCrossら

[3] が報告しており，原因真菌の同定は病理組織学的検査と真菌学的検査により行われたが，本症例では分子生物学的解析によって種の同定を行った．1995年にHIV感染患者の口腔から，これまでの形態学的同定基準では*C. albicans*と同定されるが，DNAフィンガープリントが非定型で*C. albicans*と異なり，API ID32Cを用いた炭水化物資化性がいずれの*Candida*菌種とも一致しない株が分離され，rRNA遺伝子解析から新種の*C. dubliniensis*と記載された[13]．臨床材料由来*Candida*属真菌は多種にわたり，従来法の生理・生化学及び形態による分類では対応できない菌種も存在することから，正確に*Candida*属真菌の同定を行うには，分子生物学的解析に基づいた手法が必須であると指摘されている[5]．既報告[14]のとおり，本症例のように病理組織学的検査により真菌を確認後，生材料がなく真菌培養検査を行うことができない場合，抗真菌抗体を用いた免疫染色やパラフィン包埋材料を用いた分子生物学的解析による種の同定は有用であった．

カンジダ症の発症要因には免疫機能の低下[15]や抗生物質の関与[3, 4, 15, 16]が示唆されている．牛ウイルス性下痢ウイルス感染症はさまざまな病態を示すが，持続感染牛では発育不良や免疫機能の低下がみられる[17]．本症例では牛ウイルス性下痢ウイルス感染症の関与は否定されたが，病理組織学的所見から回腸パイエル板におけるリンパ球の減少がみられたことから，免疫機能の低下があったものと推察された．また，生後5日齢から下痢症状を繰り返しており，度重なる抗生物質や消炎剤による治療がカンジダ症の発症や，致死的な病変形成を引き起こしたと考えられた．

稿を終えるに当たり，指導，助言をいただいた，(国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 小林 勝技師，嶋田恵美技師，農林水産省動物検疫所成田支所 小林芳史獣医師に深謝する．

引用文献

[1] Georgiev VS : Opportunistic Infections, Treatment and Prophylaxis, 230-290, Humana Press, New Jersey (2003)

[2] Chengappa MM, Maddux RL, Greer SC, Pincus DH, Geist LL : Isolation and identification of yeasts and yeastlike organisms from clinical veterinary sources, J Clin Microbiol, 427-428 (1984)

[3] Cross RF, Moorhead PD, Jones JE : *Candida albicans* infection of the forestomachs of a calf, J Am Vet Med

Assoc, 157, 1325-1330 (1970)

[4] Wada Y, Nakaoka Y, Matsui T, Ikeda T : Candidiasis caused by *Candida glabrata* in the forestomachs of a calf, J Comp Path, 111, 315-319 (1994)

[5] Lachance M, Boekhout T, Scorzetti G, Fell JW, Kurtzman CP : *Candida* Boekhout (1923), The Yeasts, a taxonomic study, Kurtzman CP, et al eds, 5th edn, 987-1278, Elsevier, New York (2011)

[6] Yokota T, Shibahara T, Wada Y, Hiraki R, Ishikawa Y, Kadota K : *Aspergillus fumigatus* infection in an ostrich (*Struthio camelus*), J Vet Med Sci, 66, 201-204 (2004)

[7] Murata Y, Chambers JK, Uchida K, Nakashima K, Hanafusa Y, Ikezawa M, Sugita T, Nakayama H, Murata Y : Mycotic aneurysm caused by *Graphium* species in a dog, J Vet Med Sci, 77, 1285-1288 (2015)

[8] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J : Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, PCR Protocols, Innis MA, et al eds, 315-322, Academic Press, London (1990)

[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] 若山 恵, 渋谷和俊, 直江史郎 : カンジダ症の病理像と真菌形態, 臨床と微生物, 28, 149-154 (2001)

[11] 大野尚仁 : 真菌の病原因子と宿主応答カンジダ, 臨床と微生物, 34, 15-22 (2007)

[12] Gow NA, Brown AJ, Odds FC : Fungal morphogenesis and host invasion, Curr Opin Microbiol, 5, 366-371 (2002)

[13] Sullivan DJ, Westerneng TJ, Haynes KA, Bennett DE, Coleman DC : *Candida dubliniensis* sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals, Microbiology, 141, 1507-1521 (1995)

[14] Munday JS, Laven RA, Orbell GM, Pandey SK : Meningoencephalitis in an adult cow due to *Mortierella woifli*, J Vet Diagn Invest, 18, 619-622 (2006)

[15] 高桑一雄, 池本安夫, 杉村崇明, 金城俊夫 : *Candida albicans* による牛乳房炎について, 日獣会誌, 19, 100-104 (1966)

[16] Crawshaw WM, MacDonald NR, Duncan G : Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after intramammary antibiotic treatment, Vet Rec, 156, 812-813 (2005)

[17] 田島誉士 : 牛ウイルス性下痢ウイルス感染症, 日獣会誌, 65, 111-117 (2012)

Candidiasis Caused by *Candida albicans* in the Forestomachs of a Calf

Koka TAKIZAWA^{1)†}, Takashi MIZUNO²⁾, Makoto NAKAHARA¹⁾, Toshiyuki MATSUURA¹⁾,
Naoto IMAI³⁾, Tilusha MANCHANAYAKE⁴⁾, Yasuko HANAFUSA⁵⁾
and Tomoyuki SHIBAHARA⁵⁾

- 1) *Gunma Livestock Health Laboratory, 2425-3 Kogure, Fujimimachi, Maebashi, 371-0103, Japan*
- 2) *Livestock Hygiene Division, Gunma prefectural Chubu General Agricultural Office, 315 Kamiginagaisomachi, Maebashi, 379-2165, Japan*
- 3) *Fukushima prefectural Kenchu Livestock Hygiene Service Center, 2 Mansuida, Tomitamachi, Koriyama, 963-8041, Japan*
- 4) *Division of Pathology, Veterinary Research Institute, Gannoruwa, Peradeniya, 20400, Sri Lanka*
- 5) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

An 86-day-old Japanese black calf reared at a farm in Gunma Prefecture died as a result of diarrhea. In the necropsy, a whitish yellow pseudomembrane was found on the mucosal surfaces of the rumen, reticulum and omasum. Histologically, severe neutrophil infiltration, marked parakeratosis and hyperkeratosis with numerous yeast-like fungi and pseudomycelia were seen on the mucous epithelium of the rumen, reticulum and omasum. The fungus was identified as *Candida albicans* based on morphological and immunohistochemical findings and a molecular biological analysis of a DNA sample obtained from the paraffin-embedded tissue of the rumen, reticulum and omasum lesions. — Key words : calf, *Candida albicans*, forestomachs.

† Correspondence to : Koka TAKIZAWA (Gunma Livestock Health Laboratory)

2425-3 Kogure, Fujimimachi, Maebashi, 371-0103, Japan

TEL 027-288-2106 FAX 027-288-2161 E-mail : taki-ko@pref.gunma.lg.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 219 ~ 223 (2017) —