

前胃に広範な丘疹状病変を伴ったホルスタイン種子牛の 偽牛痘の1例

小島浩一^{1)†} 加藤貴誉湖¹⁾ 谷本朱紀²⁾ 戸崎香織¹⁾
大竹祥紘¹⁾ 米山州二¹⁾ 芝原友幸^{3),4)}

- 1) 栃木県県央家畜保健衛生所 (〒321-0905 宇都宮市平出工業団地6-8)
- 2) 栃木県県北家畜保健衛生所 (〒329-2713 那須塩原市緑2-12-14)
- 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)
- 4) 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 (〒598-8531 泉佐野市りんくう往来北1-58)

(2018年9月8日受付・2019年1月24日受理)

要 約

2カ月齢のホルスタイン種子牛が、下痢を呈し斃死した。剖検では、口唇、舌、口蓋、食道及び前胃の粘膜の広範囲に重度の白色クリーム状の偽膜を伴った丘疹、び爛がみられた。組織学的に、口唇、口蓋、舌、第一胃、第二胃及び第三胃において、有棘細胞の顕著な増生と好酸性細胞質内封入体を伴う風船様変性による上皮の肥厚がみられた。免疫組織化学的に、病変部にパラポックスウイルス (PPV) 家兎血清に対する陽性反応がみられ、超微形態学的に同ウイルス粒子が確認された。舌乳剤上清と第三胃のパラフィン切片からPPV特異遺伝子が検出され、PCR産物の制限酵素断片長多型解析並びに塩基配列から偽牛痘ウイルスに分類された。以上の成績から、本症例は前胃に広範な丘疹状病変を伴った偽牛痘と診断した。——キーワード：子牛、前胃、偽牛痘ウイルス。

-----日獣会誌 72, 407~412 (2019)

パラポックスウイルス (PPV) 属は反芻動物の口唇、鼻、口腔粘膜及び乳頭に丘疹、水疱及び膿疱等を引き起こす [1]。そのため、PPV感染症は類似の病変を形成する口蹄疫、牛ウイルス性下痢粘膜病、悪性カタル熱 (MCF) などとの類症鑑別が重要な疾病である。

牛のPPVには牛丘疹性口炎ウイルス (BPSV)、偽牛痘ウイルス (PCPV) が知られている [1]。牛丘疹性口炎は家畜伝染性疾病に指定され届出が必要となる。BPSVは、おもに口腔粘膜、鼻及び舌などに丘疹を形成し、しばしば食道や乳頭に重度の潰瘍や痂皮を形成する [2-4]。一方、PCPVは乳頭、口唇などに水疱や丘疹を形成し、さらに人では搾乳者小結節を引き起こす [1, 5, 6]。近年、PCPVによる鼻鏡 [7]、外陰部及び膣 [8, 9] の病変が確認されている。BPSVとPCPVは臨床症状や病変分布等が非常に類似し、現在は遺伝学的解析により分類されている。

今回、ホルスタイン種肉用子牛に口唇、舌、口蓋、食道及び前胃粘膜に至る広範囲に丘疹状病変がみられた症例に遭遇した。本症例は第三胃病変部のパラフィン切片からPPV遺伝子が検出され、PCR産物の制限酵素断片長多型解析並びに塩基配列からPCPVと同定された。PCPVにより口腔粘膜から前胃の粘膜に至る広範囲に病変が形成されたまれな症例と考えられたので、その概要を報告する。

材料及び方法

発生状況：2017年3月2日、ホルスタイン種及び交雑種の肥育牛626頭を飼養する栃木県内の肥育農場において、2カ月齢のホルスタイン種子牛1頭が39.5℃の発熱、下痢を呈した。補液、抗生剤及び収斂剤が投与され、自力哺乳するまでに回復したものの、下痢は改善されず3月15日に死亡した。本症例は2017年2月20日

† 連絡責任者：小島浩一 (栃木県県央家畜保健衛生所)

〒321-0905 宇都宮市平出工業団地6-8

☎ 028-689-1200 FAX 028-689-1279

E-mail : kojimah03@pref.tochigi.lg.jp

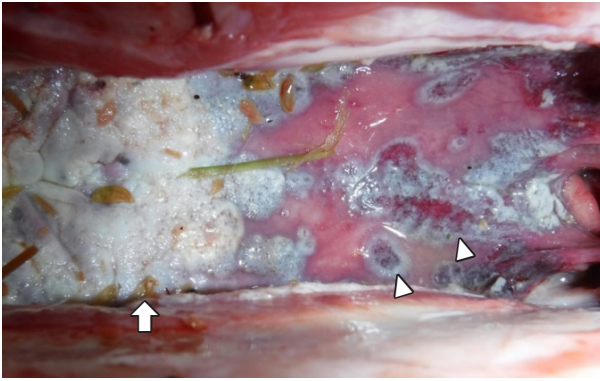


図1 口蓋の剖検写真

硬口蓋では白色クリーム状の偽膜を伴った丘疹(矢印)がみられ、軟口蓋では白色偽膜様物を伴うび爛(矢頭)がみられる。



図2 第一胃粘膜の剖検写真

第一胃粘膜に白色の偽膜様物の付着(点線)がみられる。

家畜市場で取引され、取引から農場導入(2017年2月23日)までの3日間、他の家畜市場等を輸送トラック内で移動した。本農場では、本症例を含む家畜市場から導入した哺乳子牛は1頭ずつ単房で飼養していた。その他の飼養牛に異常は認められなかった。

病理学的検査:死亡が確認された約6時間後に解剖し、口唇、舌、口蓋、食道、第一胃、第二胃、第三胃、第四胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸、肝臓、腎臓、心臓、肺、脳、胸腺、腸間膜リンパ節、浅頸リンパ節及び膝窩リンパ節は20%中性緩衝ホルマリン液で固定してパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を行った。

免疫組織化学的検査:口唇、舌、口蓋、食道、第一胃、第二胃及び第三胃のパラフィン切片について、抗BPSV(Chiba strain [10])家兎血清を用いて、市販キットヒストファインシンプルステインMAX-PO(MULTI)及びシンプルステインAEC溶液(株ニチレイバイオサイエンス、東京)の手順に従い実施した。

電子顕微鏡学的検査:ホルマリン固定後の第三胃病変部の一部を1%オスミウム酸で固定し、エボン包埋後超薄切片を作製し、酢酸ウラン、クエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡(H-7500、(株)日立製作所、東京)により観察した。

細菌学的検査:肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、気管スワブ及び大脳を5%羊血液加寒天培地及びDHL寒天培地を用いて、5%炭酸ガス下及び好気下で37℃24時間培養した。空腸内容物は滅菌生理食塩水で10倍段階希釈し、5%卵黄加CW寒天培地を用いて嫌気条件下で、DHL寒天培地を用いて好気条件下で37℃24時間定量培養した。大腸菌の線毛抗原の検査は、毒素原性大腸菌線毛抗血清(デンカ生研(株)、東京)を用いて実施した。

ウイルス学的検査:舌及び気管乳剤上清を牛腎初代培

養(BK)細胞、牛胎子筋肉(BFM)細胞及び牛腎株化(MDBK)細胞にそれぞれ接種し、細胞変性効果(CPE)の有無を確認した。

舌、気管乳剤上清及び第三胃パラフィン切片からSepa Gene(積水メディカル(株)、東京)によりDNAを抽出、Inoshimaら[11]の報告に従い、PPVのエンベロープ蛋白をコードするB2L遺伝子を検出するsemi-nested PCR(PPP-1/PPP-4、PPP-3/PPP-4)を実施した。PCR法で増幅されたPPV遺伝子(594bp)は*Xmn* I、*Pf*M I及び*Drd* I(ニュー・イングランド・バイオラボジャパン(株)、東京)を用いて制限酵素断片長多型(RFLP)解析を行った[12]。さらに、PCR増幅産物については、市販のシーケンスキット(DTCS Quick Start Master Mix kit, Beckman Coulter, U.S.A.)によりサイクルシーケンス反応を行い、オートシーケンサー(Genome Lab GeXP, Beckman Coulter, U.S.A.)で解析することで塩基配列を特定した。

得られた塩基配列は、フリーソフトのMEGA7(<http://www.megasoftware.net>)で整列化し、GenBankから収集したPPV遺伝子とともにNeighbor-joining法により分子系統樹を作成し、遺伝的距離についてはmaximum composite likelihood法により算出し、ブートストラップ検定は、1,000回実施した。なお、類症鑑別として、舌及び気管乳剤上清についてはMCFウイルス(MCFV)[13]、牛ウイルス性下痢ウイルス(BVDV)[14]、ブルータングウイルス(BTV)及び流行性出血病ウイルス(EHDV)群[15]を検出するPCR法またはRT-PCR法を行った。

結 果

病理解剖所見:口唇、舌、口蓋及び食道において、白色クリーム状の偽膜を伴った丘疹と一部び爛がみられた

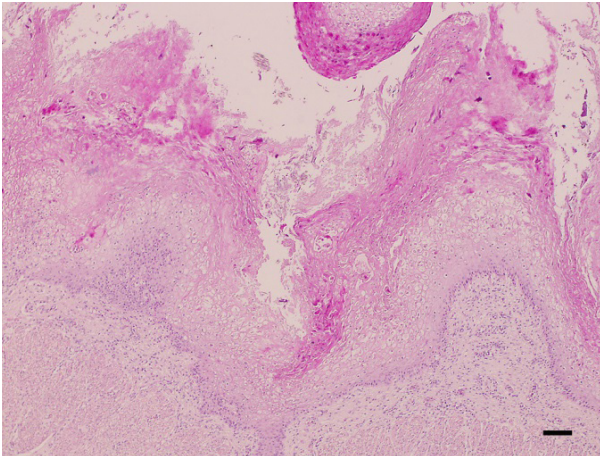


図3 第三胃の病理組織所見 (HE)
第三胃粘膜では、角質層の変性・壊死を伴う乳頭状の上皮の肥厚が散見され、有棘細胞は風船様変性を呈し著しく増生している (Bar=100 μ m).

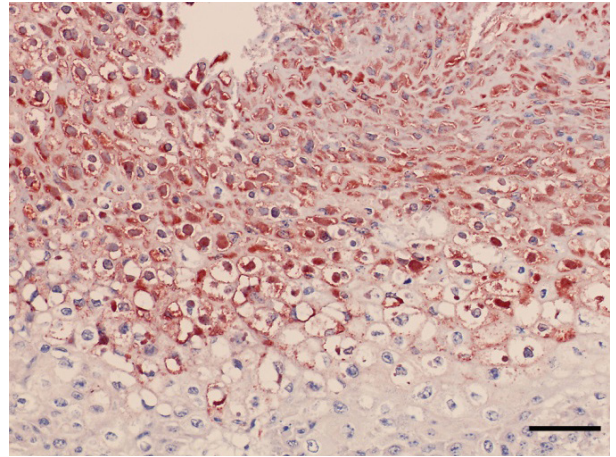


図5 第三胃の免疫組織化学所見
第三胃の有棘細胞の好酸性細胞質内封入体に一致して抗BPSV家兎血清に対する陽性反応が認められる。免疫組織化学 (Bar=50 μ m).

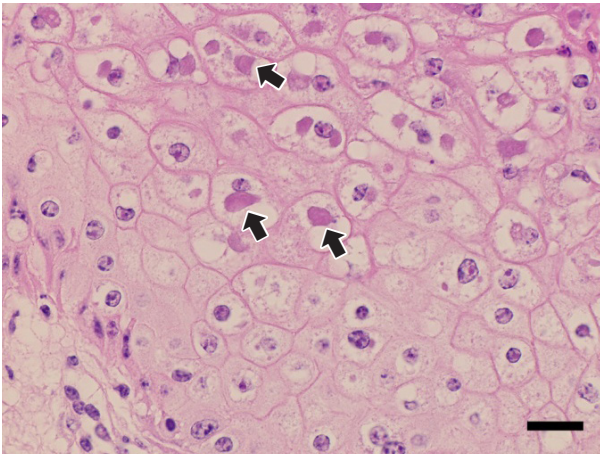


図4 第三胃の病理組織所見 (HE)
第三胃の風船様変性した有棘細胞の細胞質内には多数の不定形の好酸性細胞質内封入体 (矢印) が認められる (Bar=20 μ m).

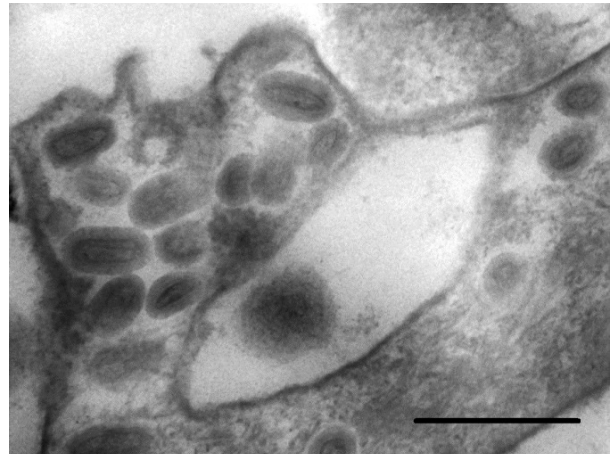


図6 第三胃粘膜上皮の透過電子顕微鏡写真
有棘細胞の細胞質内に楕円形の成熟ウイルス粒子が多数確認される (Bar=500 μ m).

(図1). 第一胃から第三胃の粘膜では白色偽膜様物が付着する広範な丘疹状病変の形成がみられた (図2). 第一胃内には長さ120cmの塊化したロープが存在した. 胸腔内には黄濁色の胸水が多量に貯留し、肺は横隔膜と癒着し、赤色・硬化を呈していた.

病理組織学的所見: 剖検で白色偽膜様物を伴った第一胃から第三胃の病変部では、角質層の顕著な肥厚がみられ、一部は乳頭状に隆起していた (図3). この肥厚した角質層では、無数の細菌塊を伴う変性・壊死や細胞退廃物の貯留を伴う膿疱形成が認められ、び爛を呈する部位も認められた. 有棘層では有棘細胞の増生が顕著であり、不定形の好酸性細胞質内封入体を伴う重度の風船様変性が散見された (図4). 同様の病変は口唇、舌、口蓋及び食道でも認められた.

免疫組織化学的に、口唇、舌、口蓋、食道、第一胃、第二胃及び第三胃において、有棘層の風船様変性した細胞の好酸性細胞質内封入体に一致して、BPSV家兎血清に対する陽性反応が認められた (図5).

その他の臓器では、胸腺の重度の萎縮、腸間膜リンパ節、浅頸リンパ節、膝窩リンパ節のリンパ濾胞における中等度のリンパ球減少、肺では、壊死巣に燕麦様細胞が集簇する特徴的な重度の壊死性化膿性気管支肺炎と線維素性化膿性胸膜炎が認められた. なお、第四胃、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸及び直腸に著変は認められなかった.

電子顕微鏡学的検査所見: 第三胃病変部の有棘細胞の細胞質内に、長径250~300nm×短径100~150nmのダンベル型のコアを2層の膜が取り囲む形態を示す成熟

ウイルス粒子が多数認められた (図6).

細菌学的検査所見: 肺, 気管スワブから *Mannheimia haemolytica*, 気管スワブから *Mycoplasma bovirhinis* が分離された. 空腸内容物から嫌気条件下でクロストリジウム属菌は分離されず, 好気条件下では大腸菌群の菌数は 4.0×10^8 CFU/g であり, 分離した大腸菌の線毛抗原については K99 抗原は陰性であった.

ウイルス学的検査所見: 各種材料を接種した培養細胞に CPE は確認されなかった. 遺伝学的検査では, PPV を対象とした PCR 法において, 1st PCR では舌乳剤上清から, semi-nested PCR では第三胃パラフィン切片から特異遺伝子が検出された. 舌乳剤上清由来の 1st PCR 産物を用いた RFLP 解析では, *Pfl*M I 処理でのみ切断が確認され, 既知の PCPV と同様であった (図7). シークエンス解析では, 第三胃パラフィン切片由来の semi-nested PCR 産物でのみ成功し, その塩基配列は分子系統樹解析において既知の PCPV と同一のクラスターに分類された (図8). なお, 各種材料から MCFV, BVDV, BTV 及び EHDV の特異遺伝子は検出されなかった.

考 察

今回, 発熱・下痢を呈し死亡したホルスタイン種子牛の口唇, 舌, 口蓋, 食道及び前胃の広範囲に丘疹及び爛が確認され, 組織学的に有棘細胞の顕著な増生と細胞質内封入体を伴う風船様変性がみられた. 舌乳剤上清及び第三胃のパラフィン切片から検出された PPV 特異遺伝

子は, RFLP 解析及び分子系統樹解析の結果から PCPV と同定された. さらに, 第三胃に確認されたウイルス粒子は, 中心部に楕円形のコアを有しその周囲に膜が形成されており, 最外層にはエンベロープを有し, 既知 [16, 17] のパラポックスウイルスと形態的に一致していた. 一方, 肺では *Mannheimia haemolytica* による重度の肺炎と胸膜炎が認められた. 以上のことから, 本症例は牛マンヘミア症及び偽牛痘と診断され, 肺炎が重篤化し

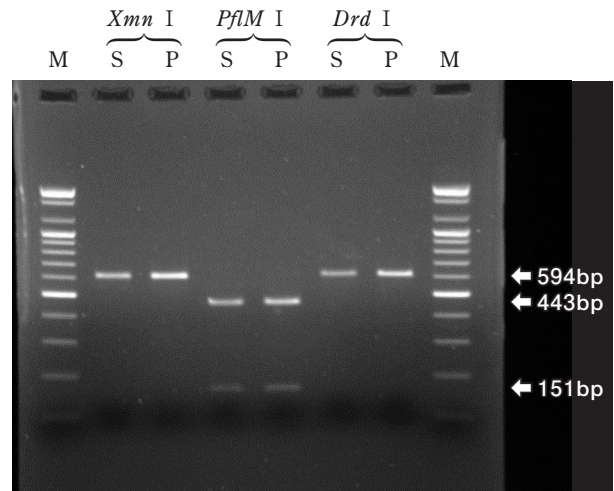


図7 パラポックスウイルスの増幅遺伝子を用いた RFLP 解析

M: 100bp ladder, S: 舌由来の PCR 産物, P: 既知の PCPV (栃木株*)

*すでに B2L 領域のシークエンスにより PCPV と同定されている株

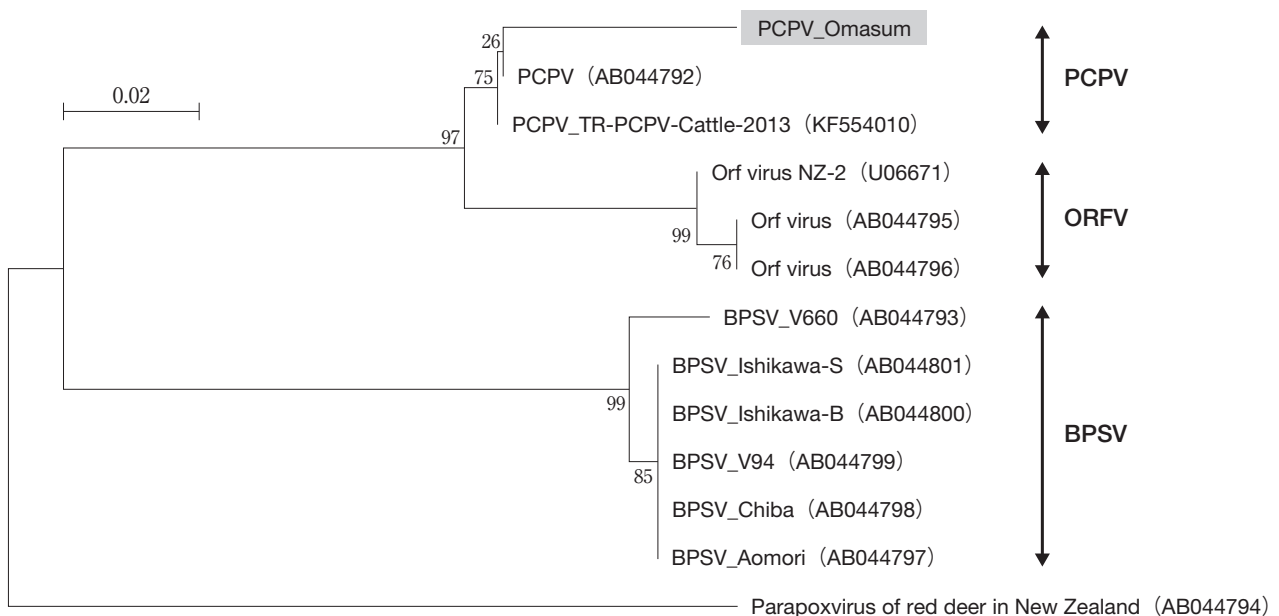


図8 B2L 遺伝子 (194bp) の塩基配列に基づく既知 PPV との分子系統樹解析

系統樹上の数値はブストラップ値 (パーセンテージ) であり, スケールバーは塩基置換率を示す.

網掛け部分は今回検出した株を表し, それ以外の株についてはすべて株名 (GenBank) アクセス番号の順で示してある. 系統樹の右側には, ウイルス種を示す.

斃死したものと考えられた。

稟告では下痢が主訴であり、口唇、舌、口蓋、食道及び前胃に丘疹あるいは白色偽膜様物が付着する丘疹状病変が認められたものの、その他の腸管では著変はなく、クロストリジウム属菌や大腸菌の関与についても言及することができず、下痢の原因については不明であった。

一般的に PCPV 感染症は乳頭に病変を形成するとされていたが、国内の PCPV の初分離事例 [18] では、乳頭のほか、舌、口腔粘膜に水疱病変が確認されている。また、外陰部や膣病変部からもウイルス分離や遺伝子が検出され [8, 10]、病変分布は多様である。本症例では、口腔粘膜や鼻のみならず消化管である第一胃～第三胃の粘膜にも白色偽膜様物が付着する丘疹状病変が観察された点が非常にまれで興味深い。一方、BPSV 感染症では病変が重篤化した場合に前胃まで病変を形成するとされている [1, 19]。

このことから、BPSV、PCPV のいずれにおいても、同様の組織構造を有する口腔粘膜、鼻粘膜、舌、食道及び前胃に病変を形成し得ると考えられ、病変部位による識別は困難であることが本症例でも再確認された。PPV は、潜在感染から免疫機能の低下によりウイルスが再活性化する [20]。また、PPV 感染症では病変が局限し全身症状を伴うことはほとんどないが、BVDV や牛伝染性鼻気管炎ウイルス等の他の病原体の二次感染や重感染 [21-23]、ストレスを受けた際に重篤化する [20]。

本症例では、胸腺の萎縮やリンパ系組織におけるリンパ球の減少がみられた。また、本症例は3日間、トラック内で移送され、導入時の栄養状態は良好ではなかった。さらに、重篤な肺炎を呈していたことにより、体力は著しく低下していたものと考えられた。このことから、本症例は輸送ストレスにより免疫機能が低下し、かつ肺炎を併発したことにより、口腔から前胃に至る広範囲に丘疹状病変が形成されるに至ったと考えられた。

剖検において、第一胃粘膜と誤食したロープが癒着しているのが確認された。このロープにより第一胃粘膜が損傷し、口腔内で増殖した PCPV が第一胃粘膜に定着・増殖に至った一因とも考えられたが、詳細は不明である。一方、BPSV 感染症では口蹄疫、BVD、悪性カタル熱等の類症鑑別が必要である。本症例では、口蹄疫の好発部位とされる口唇、鼻腔及び舌上部などにはび爛、潰瘍あるいは水疱形成などはほとんどみられず、白色偽膜様物の付着を伴う上皮の増殖性病変が観察され、発生農場のその他の飼養牛 626 頭にも異常は確認できなかったことから、口蹄疫は否定された。また、BVDV や MCFV 等のウイルスについても遺伝子は検出されず否定された。

BPSV 感染症では、重度の病変が確認された報告はあるものの [2-4]、本症例のように PCPV が関与して前

胃に広範囲に重篤な丘疹状病変が確認された報告はなく、報告する価値があると考えられた。

稿を終えるにあたり、抗体を提供いただいた国立大学法人岐阜大学の猪島康雄教授に深謝する。

引用文献

- [1] Barker IK, Dreumel AAV, Palmer N : Parapoxviral infections, Pathology of domestic animals, Jubb KVF, et al eds vol.2, 6th ed, 139-140, Elsevier, Missouri (2015)
- [2] Jeckel S, Bidewell C, Everest D, McInnes C, Wood A, Dare J, Schock A : Severe oesophagitis in an adult bull caused by bovine papular stomatitis virus, Vet Rec, 169, 317 (2011)
- [3] Inoshima Y, Nakane T, Sentsui H : Severe dermatitis on cattle teats caused by bovine papular stomatitis virus, Vet Rec, 164, 311-312 (2009)
- [4] Leonard D, Otter A, Everest D, Wood A, McInnes C, Schock A : Unusual bovine papular stomatitis virus infection in a British dairy cow, Vet Rec, 164, 65 (2009)
- [5] Lederman E, Kahn SU, Luby S, Zhao H, Braden Z, Gao J, Karem K, Damon I, Reynolds M, Li Y : Zoonotic parapoxviruses detected in symptomatic cattle in Bangladesh, BMC Research Notes, 7, 816 (2014)
- [6] Oğuzoğlu TÇ, Koç BT, Kirdecı A, Tan MT : Evidence of zoonotic pseudocowpox virus infection from a cattle in Turkey, VirusDiseas, 25, 381-384 (2014)
- [7] Cargnelutti JF, Flores MM, Teixeira FR, Weiblen R, Flores EF : An outbreak of pseudocowpox in fattening calves in southern Brazil, J Vet Diagn Invest, 24, 437-441 (2012)
- [8] Blomqvist G, Ullman K, Segall T, Hauenberger E, Renström L, Persson-Waller K, Leijon M, Valarcher JF : An unusual presentation pseudocowpox associated with an outbreak of pustular ulcerative vulvovaginitis in Swedish dairy herd, J Vet Diagn Invest, 30, 256-259 (2018)
- [9] Moeller RB Jr., Crossley B, Adaska JM, Hsia G, Kahn R, Blanchard PC : Parapoxviral vulvovaginitis in Holstein cows, J Vet Diagn Invest, 30, 464-467 (2018)
- [10] Kuroda Y, Yoshida M, Shibahara T, Matsui T, Nakane T, Hara H, Inoshima Y, Sentsui H : An epidemic of parapoxvirus infection among cattle: isolation and antibody survey, J Vet Med Sci, 61, 749-753 (1999)
- [11] Inoshima Y, Morooka A, Sentsui H : Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction, J Virol Methods, 84, 201-208 (2000)
- [12] Inoshima Y, Murakami K, Yokoyama T, Sentsui H : Genetic heterogeneity among parapoxviruses isolated from sheep, cattle and Japanese serows (*Capricornis crispus*), J Gen Virol, 82, 1215-1220 (2001)
- [13] Baxter SI, Pow I, Bridgen A, Reid HW : PCR detection of the sheep-associated agent of malignant catarrhal fever, Arch Virol, 132, 145-159 (1993)

- [14] 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)
- [15] 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)
- [16] Okada HM, Okada K, Numakunai S, Ohsima K : Electron microscopy on mucosal and cutaneous lesions in contagious papular dermatitis of Japanese Serow (*Capricornis crispus*), *J Vet Med Sci*, 46, 297-302 (1984)
- [17] 高橋真紀, 清宮幸男, 関 慶久, 本川正人, 熊谷芳浩, 芝原友幸, 木村久美子, 播谷 亮 : 牛丘疹性口炎に罹患した黒毛和種子牛の1例, *日獣会誌*, 63, 359-363 (2010)
- [18] Ohtani A, Yokoyama A, Narushige H, Inoshima Y : First isolation and genetic characterization of pseudocowpox virus from cattle in Japan, *Virology*, 14, 172 (2017)
- [19] Yeruham I, Abraham A, Nyska A : Clinical and pathological description of a chronic form of bovine papular stomatitis, *J Comp Pathol*, 111, 279-286 (1994)
- [20] Iketani Y, Inoshima Y, Asano A, Murakami K, Shimizu S, Sentsui H : Persistent parapoxvirus infection in cattle, *Microbiol Immunol*, 46, 285-291 (2002)
- [21] Nagington J, Lauder IM, Smith JS : Bovine papular stomatitis, pseudocowpox and milker's nodules, *Vet Rec*, 81, 306-313 (1967)
- [22] Bohac JG, Yates WD : Concurrent bovine virus diarrhea and bovine papular stomatitis infection in a calf, *Can Vet J*, 21, 310-313 (1980)
- [23] Dal Pozzo F, Martinelle L, Gallina L, Mast J, Sarradin P, Thiry E, Scagliarini A, Büttner M, Saegerman C : Original findings associated with two cases of bovine papular stomatitis, *J Clin Microbiol*, 49, 4397-4400 (2011)

Pseudocowpox with Extensive Papular Lesions in the Forestomachs of a Holstein Calf

Hirokazu KOJIMA^{1)†}, Kiyoko KATO¹⁾, Aki TANIMOTO²⁾, Kaori TOSAKI¹⁾, Yoshihiro OOTAKE¹⁾, Shuji YONEYAMA¹⁾ and Tomoyuki SHIBAHARA^{3),4)}

- 1) *Tochigi Prefectural Central Livestock Health and Hygiene Center, 6-8 Hiraide-kougyodanchi, Utsunomiya, 321-0905, Japan*
- 2) *Tochigi Prefectural Northern Livestock Health and Hygiene Center, 2-12-14 Midori, Nasu-shiobara, 329-2713, Japan*
- 3) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*
- 4) *Department of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku-oraikita, Izumisano, 598-8531, Japan*

SUMMARY

A two-month-old Holstein calf exhibited diarrhea and subsequently died. During the necropsy, a cream-colored pseudodiphtheritic membrane (papules) and severe erosion were found on the mucosal surfaces of the lips, tongue, palate, esophagus and forestomachs. Histopathologically, marked thickening of the epithelium, severe keratosis and epithelial proliferation with ballooning degeneration, and intracytoplasmic eosinophilic inclusion bodies in the cells comprising the prickle cell layer were seen on the lips, tongue, palate, esophagus, rumen, reticulum and omasum. Parapoxvirus antigens and parapoxvirus-like particles were found immunohistochemically and electronmicroscopically in the lesions of the omasum. Virologically, the viral DNA obtained from the paraffin-embedded tissue of the omasum lesions was classified as pseudocowpox virus by nucleotide sequencing or restriction fragment length polymorphism analysis. Based on the results, the disease was diagnosed as pseudocowpox with extensive papular lesions in the forestomachs of a Holstein calf.

— Key words : calf, forestomach, pseudocowpox virus.

† Correspondence to : Hirokazu KOJIMA (Tochigi Prefectural Central Livestock Health and Hygiene Center) 6-8 Hiraide-kougyodanchi, Utsunomiya, 321-0905, Japan
TEL 028-689-1200 FAX 028-689-1279 E-mail : kojimah03@pref.tochigi.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 407 ~ 412 (2019)