

Scedosporium apiospermum complex による壊死性胎盤炎がみられた黒毛和種牛の流産

川島悠登^{1)†} 中谷敦子¹⁾ 宮根和弘¹⁾ 花房泰子²⁾ 芝原友幸^{2),3)}

- 1) 北海道十勝家畜保健衛生所 (〒089-1182 帯広市川西町基線 59-6)
 2) 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)
 3) 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)

(2020年9月10日受付・2021年3月1日受理)

要 約

2017年8月、北海道十勝管内の黒毛和種牛が流産した。母牛の胎盤組織は真菌感染を伴う壊死性胎盤炎を呈し、組織中の真菌の形態は *Aspergillus* 属真菌に類似していた。一方、胎盤から分離された真菌は、形態的特徴及びDNAのITS領域の分子生物学的解析により *Scedosporium apiospermum* complex と同定され、本症例の流産は本真菌の感染が原因と考えられた。本真菌は日本国内でも土壌や河川の水中に広く生息し、人では難治性肺炎の原因の一つとして知られている真菌である。しかし、畜産分野における症例報告は少なく、これまで日本国内で牛の流産胎盤から本真菌が分離された報告はない。本真菌の組織中の形態は *Aspergillus* 属真菌にきわめて類似しており、診断には分子生物学的解析の併用が不可欠と考えられた。

——キーワード：流産、真菌性胎盤炎、*Scedosporium apiospermum* complex.

-----日獣会誌 74, 553~557 (2021)

Scedosporium 属真菌は子囊菌に属する糸状真菌で、土壌や汚染された水中に広く生息する [1]。 *Scedosporium* 属真菌は現在10種 [2, 3] が知られ、特に *Scedosporium apiospermum* (*S. apiospermum*)、*S. boydii*、*S. ellipsoideum*、*S. angustum* 及び *S. fusoidium* の5種は、塩基配列が非常に類似することから *S. apiospermum* complex と呼ばれている [2]。 *Scedosporium* 属真菌の感染で起こる人のステドスポリウム症は、血液を介した全身性感染を起こしやすい真菌症である。また、多くの抗真菌薬に耐性を示すことから [1-3] 治療が困難であり致死率も高い [1-4]。

畜産分野では、北米において本真菌症による牛の流産報告 [5] があるが、報告例はきわめて少なく [3]、日本国内における感染例は馬の蹄真菌症 [6] があるのみで、牛における感染報告はない。

今回、北海道十勝管内の乳肉用牛混合飼養農場で飼養されていた黒毛和種牛が流産し、病理組織所見及び分離された真菌の形態的特徴及び分子生物学的解析により、

S. apiospermum complex の感染が原因であると診断したので、その概要を報告する。

材料及び方法

発生状況：2017年8月、北海道十勝管内でホルスタイン種155頭、黒毛和種13頭を飼養する農場において、2013年8月生まれの黒毛和種繁殖牛(母牛)が胎齢228日で流産し、流産胎子、胎盤及び母牛血清が病性鑑定に供された。流産後の母牛に臨床症状はみられなかった。母牛は3産目で、過去2回は正常分娩であった。母牛はフリーバーンで他の牛とともに飼養され、分娩も同じ場所であった。牛床に敷かれていた麦稈に腐敗は認められなかった。

病理学的検査：病理解剖後、母牛の胎盤並びに胎子の心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、大脳、小脳、延髄及び脊髄組織を、10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従いパラフィン包埋し、各組織より約3μmに薄切した切片を用いて、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染

† 連絡責任者(現所属)：川島悠登(北海道空知家畜保健衛生所)

〒079-0181 岩見沢市岡山町 12-37

☎ 0126-22-4212 FAX 0126-23-9676

E-mail : kawashima.yuuto@pref.hokkaido.lg.jp



図1 胎盤
胎盤丘阜部は赤褐色から茶褐色を呈す。



図2 流産胎子
軽度に削瘦. 骨格の異常はみられない。

色, 過ヨウ素酸シッフ (PAS) 反応及びグロコット染色を実施した。

免疫組織化学的検査: 胎盤組織のパラフィン切片に対し, 抗-*Aspergillus* 属抗体として *Aspergillus fumigatus* (*A. fumigatus*) マウス血清 (クローン Mab-WF-AF-1, Dako, U.S.A.), 抗-*Candida* 属抗体として抗 *Candida albicans* (*C. albicans*) ウサギ血清 (Biogenesis, U.K.) 及び抗-ケカビ垂門抗体として抗 *Rhizopus arrhizus* (*R. arrhizus*) マウス血清 (クローン Mab-WSSA-RA-1, Dako, U.S.A.) を1次抗体として用いて, 市販キット (ヒストファイン SAB-PO (MULTI) キット, ㈱ニチレイバイオサイエンス, 東京) の手順に従って実施した。

真菌学的検査: 凍結保存された母牛の胎盤を細切り, クロラムフェニコール加ポテトデキストロース寒天培地 (栄研化学㈱, 東京) に接種し, 37°Cで2週間培養した。培地上の真菌を実体顕微鏡で観察後, ラクトフェノール標本を作製し, 光学顕微鏡で観察した。分離株からのDNA抽出は, ジルコニアビーズによる物理的破砕法により行った。得られたDNAをテンプレートとし, internal transcribed spacer (ITS) 領域を増幅するプライマー-ITS1とITS4の組み合わせを用いたPCR [7]を行った。得られたPCR産物に対し, 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, The National Center for Biotechnology Information の提供する Basic Local Alignment Search Tool (BLAST: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用い, GenBank の登録塩基配列に対する解析を実施した。

細菌学的検査: 母牛の胎盤並びに胎子の心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓及び脊髄を5%羊血液加寒天培地 (極東製薬工業㈱, 東京) 及び DHL 寒天培地 (栄研化学㈱, 東京) を用いて5%炭酸ガス存在下及び好気条件下で

37°C 24 時間培養した。

ウイルス学的検査: 母牛の胎盤並びに胎子の心臓, 肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓, 大脳, 小脳及び脊髄の各乳剤から核酸を抽出し, 牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) 及びアカバネウイルス (AKV) に対し RT-PCR [8, 9], 牛伝染性鼻気管炎ウイルス (IBRV) に対し PCR [10] を実施し, 各ウイルスに対する特異的遺伝子を検索した。また, 母牛血清を用いて BVDV, AKV 及び IBRV に対し, 中和試験による抗体検査を実施した。

成 績

病理解剖所見: 胎盤丘阜部は赤褐色から茶褐色を呈していた (図1)。流産胎子は頭尾長60cm, 体重12kgの雌, 軽度に削瘦していたが, 骨格の異常はみられなかった (図2)。胎子臓器の肺はモザイク状の色調を呈し, 辺縁が鈍化していた。リンパ節は鼠径リンパ節及び肝門部リンパ節が軽度に腫大していた。その他の臓器に肉眼的異常はみられなかった。

病理組織学的所見: 胎盤丘阜部は広域に絨毛が壊死脱落し, その周囲に好中球, リンパ球及びマクロファージが浸潤していた。PAS 染色及びグロコット染色では, 絨毛部の細胞崩壊産物内に均一な太さの有隔真菌が確認された。菌糸の太さは約 2.2 μ m で, 鋭角の分岐がみられた (図3)。絨毛膜間葉組織中の血管はうっ血が著しく, 一部の動脈壁は肥厚し, 炎症細胞浸潤やフィブリノイド変性がみられた。

胎子組織は, 全身性に著しくうっ血していた。肺に含気はなく, 小葉間結合組織は水腫性に肥厚していた。一部の細気管支内には誤嚥物として細胞退廃物が貯留し, その中に胎盤で認められたものと同様の形状の真菌がみられた。また, 誤嚥がみられた細気管支周囲の肺胞内には異物巨細胞及び軽度の好中球浸潤がみられた。心臓では一部の冠状動脈周囲にリンパ球が浸潤していた。腎臓

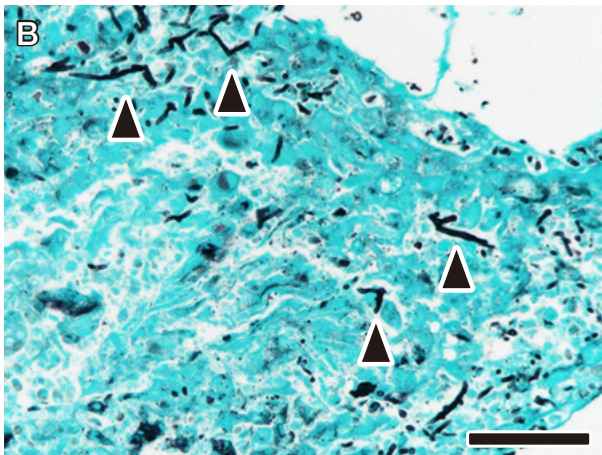
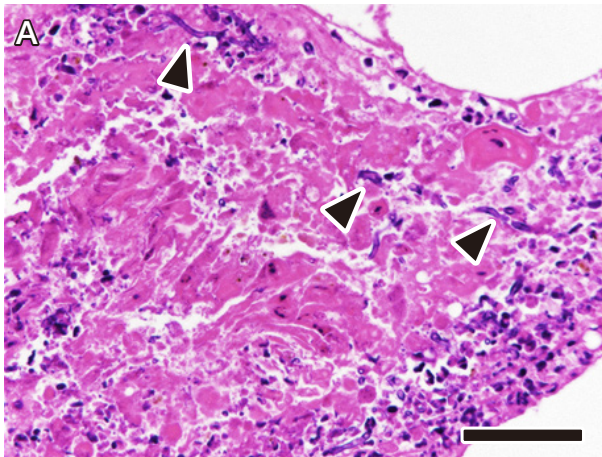


図3 胎盤組織

A：組織は壊死し，細胞の崩壊物中にY字状に分岐した均一な太さの有隔菌糸（矢頭）が散見される。（HE染色 Bar=50 μ m）

B：組織中の菌糸（矢頭）がより明瞭に観察できる。（グロコット染色 Bar=50 μ m）

では糸球体及び間質の血管内に多数の硝子血栓がみられた。その他の臓器に著変は認められなかった。

免疫組織化学的所見：胎盤組織中の真菌は，抗-*Aspergillus* 属抗体，抗-*Candida* 属抗体及び抗-ケカビ亜門抗体に対し，すべて陰性を示した。

真菌学的検査：胎盤組織から真菌が分離された。この真菌は，37 $^{\circ}$ C，1週間の培養により白色で気中菌糸を有するコロニーを形成した。コロニー表面は，初期は凸凹した盛り上がりのある白色であったが，徐々に灰褐色へと変化した（図4）。コロニーの辺縁は大きく波打っていた。コロニーの裏面は1週間の培養では黄白色であったが，2週間後には部分的に黒色を示した。実体顕微鏡で観察すると，真菌には白色菌糸と菌糸側壁から伸びた分子子柄に胞子の形成がみられた。胞子嚢や分子子頭はみられなかった。光学顕微鏡（100～400倍）によるラクトフェノール標本の観察では，褐色でレモン型の胞子がみられた（図5）。

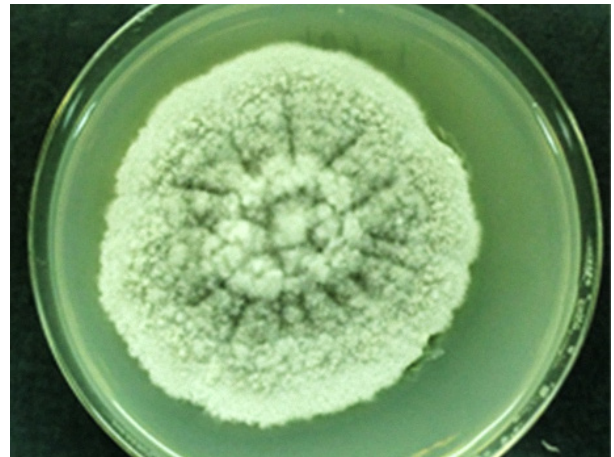


図4 分離真菌の培養13日目のコロニー表面
コロニーは灰褐色で，凹凸した盛り上りを呈す。

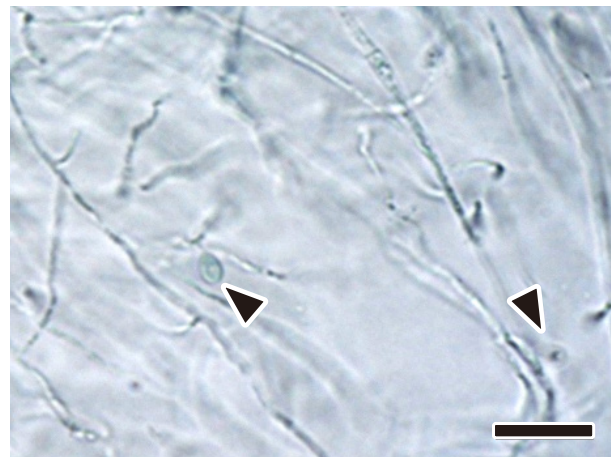


図5 分離真菌

均一な太さの有隔菌糸及びレモン型の胞子（矢頭）がみられる。（ラクトフェノール染色 Bar=20 μ m）

胎盤由来真菌株から抽出したDNAを用いた分子生物学的解析により，本真菌のITS領域は，既知の*S. apiospermum* 及び*S. boydii* の当該領域塩基配列と99.8%の類似性を示した。

細菌学的検査：細菌培養では，いずれの臓器からも流産の原因となる有意な細菌は分離されなかった。

ウイルス学的検査：各臓器の乳剤からBVDV等の特異的遺伝子は検出されず，母牛血清の抗体検査もすべて陰性であった。

考 察

本症例では，胎盤組織で絨毛の広域な壊死脱落及び炎症細胞浸潤がみられたことから，壊死性化膿性胎盤炎を呈していたと考えられた。また同組織中に真菌感染がみられ，真菌学的検査により*S. apiospermum* complexに属する真菌が分離されたことから，本症例の流産の原因は*S. apiospermum* complexに属する真菌による胎

盤炎と考えられた。真菌学的検査では、分離真菌は発育が遅く、コロニーは凹凸した盛り上がりのある白色調から徐々に灰褐色へと変化し、ラクトフェノール標本でレモン型褐色の胞子が観察され、既報の *S. apiospermum* と非常に類似する発育の特徴を示した [3, 5]。

真菌分離株から抽出した DNA の塩基配列は、既知の *S. apiospermum* 当該領域塩基配列と 99.8% の、*S. boydii* と 99.8% の類似性を示した。 *Scedosporium* 属真菌は、形態的特徴、生化学性状並びに β -tubulin, カルモジュリン及び rRNA の ITS 領域の塩基配列が類似し、2005 年以降再分類を繰り返した [2]。現在 10 種が知られ [2, 3]、特に前述の 5 種は塩基配列がきわめて類似することから、*S. apiospermum* complex として扱われている [2]。したがって、今回分離された真菌株は、*S. apiospermum* complex に属する真菌と記載することが適切であると判断した。

組織所見では、胎盤炎の病変は胎盤丘阜部の絨毛膜絨毛で最も強く、真菌は絨毛部の細胞崩壊産物内に炎症細胞浸潤を伴い、約 2.2 μ m の均一な太さ、有隔及び鋭角分岐を呈す菌糸として確認された。この特徴は *Aspergillus* 属感染による壊死性胎盤炎の組織所見 [5] 及び組織中の菌糸の形状 [1, 3] と非常に類似していた。 *Aspergillus* 属は牛の真菌性流産の胎盤から最も多く分離される [3]。本症例では、胎盤組織を材料とし、抗-*Aspergillus* 属抗体、抗-*Candida* 属抗体及び抗-ケカビ亜門抗体について免疫組織化学的検査を実施したが、すべて陰性を示したことから、胎盤組織内の真菌はこれらではないと判断された。一方、培養された真菌では、分岐した有隔菌糸の形態が他の糸状菌と鑑別困難である [1-3] ことから、本症の確定診断には、分離真菌の分子生物学的解析による同定が不可欠であると考えられた。

本真菌は土壌中に広く存在することから、本症例においても環境中から何らかの経路で感染したと考えられるが、母牛の検査が未実施であることから感染経路は特定できなかった。

家畜における *S. apiospermum* complex 感染の報告は少ない。本真菌は多くの抗真菌薬に耐性を示す [1-3] ことから、人においては、治療が困難で重度の難治性の日和見感染を起こす可能性 [2-4] が指摘されている。また、免疫能が低下してない個体に感染することも知られており [3]、国内外で津波発生後に発生する津波肺や水生事故患者、また嚢胞性線維症における気管や肺からの真菌分離例としては、*Aspergillus* 属に次いで 2 番目に多く報告されている [2]。したがって、免疫能の低下がみられない家畜においても、本真菌による難治性真菌

症が発生する可能性があり、今後、真菌症の診断をする場合において、特に組織内に *Aspergillus* 属に類似した真菌がみられた場合には *S. apiospermum* complex 感染の可能性も考慮しなければならない。

稿を終えるにあたり、本症例の提供及び発生状況の調査に協力していただいた北海道十勝農業共済組合南部事業所（現・北部事業所）診療センター木下充郎獣医師に深謝する。

引用文献

- [1] Jiang Y, Gohara AF, Mrak RE, Muldrew KL : Misidentification of *Scedosporium boydii* infection as *Aspergillus* in a patient with chronic renal failure, *Case Rep Infect Dis*, 1-6 (2020)
- [2] Luna-Rodríguez CE, Treviño-Rangel RJ, Montoya AM, Becerril-García MA, Andrade Á, González GM : *Scedosporium* spp.: Chronicle of an emerging pathogen, *Medicina Universitaria*, 21, 4-13 (2019)
- [3] Teodoro GD, Averaimo D, Primavera M, Santoleri D, Giovannini G, Cocco A, Francesco GD, Malatesta D, Defourny S, D'Alterio N, Curini V, Domenico MD, Petrini A : Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a Maremmano-Abruzzese sheepdog, *BMC Vet Res*, 16, 1-5 (2020)
- [4] Gilgado F, Cano J, Gene J, Guarro J : Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species, *J Clin Microbiol*, 43, 4930-4942 (2005)
- [5] Knudtson WU, Kirkbride CA : Fungi associated with bovine abortion in the northern plains states (USA), *J Vet Diagn Invest*, 4, 181-185 (1992)
- [6] Kuwano A, Yoshihara T, Takatori K, Kosuge J : Onychomycosis in white line disease in horses: pathology, mycology and clinical features, *Equine Vet J*, 26, 27-35 (1998)
- [7] 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, New York (1990)
- [8] 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)
- [9] Kono R, Hirata M, Kaji M, Goto Y, Ikeda S, Yanase T, Kato T, Tanaka S, Tsutsui T, Imada T, Yamakawa M : Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan, *BMC Vet Res*, 4, 20 (2008)
- [10] Vilcek S : Detection of the bovine herpesvirus-1 (BHV-1) genome by PCR, *J Virol Methods*, 41, 245-247 (1993)

Abortion of Japanese Black Cattle Identified Necrotizing Placentitis Caused
by *Scedosporium apiospermum* Complex Infection

Yuuto KAWASHIMA^{1)†}, Atsuko NAKATANI¹⁾, Kazuhiro MIYANE¹⁾,
Yasuko HANAFUSA²⁾ and Tomoyuki SHIBAHARA^{2),3)}

- 1) *Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center, 59-6 Kisen, Kawanishi, Obihiro, 089-1182, Japan*
- 2) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*
- 3) *Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku-oraiikita, Izumisano, 598-8531, Japan*

SUMMARY

In August 2017, a Japanese Black cattle aborted, in Tokachi, Hokkaido. The placenta tissue of the mother cow showed necrotizing placentitis associated with a fungus that was of a similar shape to *Aspergillus*. A fungus isolated from the placenta was identified as *Scedosporium apiospermum* (*S. apiospermum*) complex based on the shape and the internal transcribed spacer rDNA sequencing. Therefore, it was diagnosed that the abortion was caused by *S. apiospermum* complex infection. This fungus, which is found in soil and contaminated water in Japan, is known as one of the causes of severe pneumonia in humans. However, there are few reports of infection with *S. apiospermum* complex in livestock, and this is the first reported case in which *S. apiospermum* complex was isolated from the placenta of an aborted cattle in Japan. Genetic analysis was considered essential for diagnosis, in addition to histopathology, because the *S. apiospermum* complex showed a very similar shape to *Aspergillus* in the tissue.

— Key words : abortion, fungal placentitis, *Scedosporium apiospermum* complex.

† Correspondence to (Present address) : Yuuto KAWASHIMA (Hokkaido Sorachi Livestock Hygiene Service Center)
12-37 Okayamacho, Iwamizawa, 079-0181, Japan
TEL 0126-22-4212 FAX 0126-23-9676
E-mail : kawashima.yuuto@pref.hokkaido.lg.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 74, 553 ~ 557 (2021)