

【試験研究】

牛ウイルス性下痢持続感染牛の病理組織学的検討

奥村尚子¹⁾ 豊島靖²⁾

1) 家畜衛生試験場 2) 畜産研究センター

【目的と背景】

牛ウイルス性下痢ウイルス (Bovine viral diarrhoea virus: BVDV) は、生物型では細胞病原性 (CP) と非細胞病原性 (NCP) に分かれ、遺伝子型では、1 型と 2 型に分けられる。非妊娠牛に感染すると不顕性に終わる事が多く、子牛では一過性の発熱や下痢を引き起こす。抗体陰性妊娠牛への NCP 株の感染は、胎子へ垂直感染、死産や奇形等をおこし、胎齢 100 日以下の胎子へ感染した場合、BVDV を寛容し、出生後、持続感染牛 (PI 牛) となる。PI 牛は、発育不良・慢性下痢・肺炎・不受胎などを呈し、ウイルスを一生排泄しつづけ、粘膜病を発症する。また PI 牛の子は、PI 牛となる。本県では 2010 年に初めて BVDV2 型の流行、難治性下痢、PI 牛の摘発があった。PI 牛は、しばしばリンパ組織の低形成 (病鑑指針より) が認められる [1] が、BVDV に免疫寛容のため、細胞反応が乏しい。本研究の目的は、PI 牛の特定病変と抗原分布について明らかにすることである。

【材料と方法】

検討 1: PI 牛の病変の有無と特定病変の検討のため 2014 年から 2019 年までに PI 牛と診断された 14 症例の脳、心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓、脊髄、腸管を 10 % 中性緩衝ホルマリン液で固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE) した。

検討 2: 検討 1 にて共通所見がみられた腎臓、脳を用いて抗 BVDV 抗体 (VMRD 社, clone348) の免疫組織化学的染色 (IHC) を実施。IHC の方法は図 1 に記す。

検討 3: 2004~2006 年の症例のうち、共通所見が得られた BVDV 未検出の 4 症例の脳、腎臓、肝臓について HE 染色および抗 BVDV 抗体による IHC を実施。

- 方法: ポリマー法
- 抗原賦活化法: マイクロウェーブ 500W 5分x3回、クエン酸バッファー (pH6.0)
- 一次抗体: 抗 BVDV マウスモノクローナル抗体 Cell line 348 (VMRD)
- 希釈濃度と反応時間: 250倍、4°C/over night
- 二次抗体: ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (M) (ニチレイ)
- 発色基質: シンプルステイン DAB または AEC (ニチレイ)
- 発色時間: 5~10分

図1 IHC の方法について

【結果】

検討 1: 検索した 14 症例の年齢は、11 日齢から 34 カ月齢であった。3 カ月齢未満の子牛症例では、6/8 症例 (75%) にて、発育不良や発咳、鼻汁、下痢、急死などがみられ、7/8 症例 (87.5%) において肺の肝変化や硬化巣が認められ、マイコプラズマや *Pasteurella multocida* などの呼吸器疾病の病原体が検出された (図 2)。3 カ月齢以上の 6 症例では、臨床症状と解剖所見に乏しかった (図 3)。

症例	日齢	臨床症状	肉眼病変 有無		呼吸器疾病病原体検出
			肺、肺門リンパ節	消化管粘膜	
1	11	急死・発育不良	×	○	×
2	45	発咳、鼻汁	○	○	○
3	45	発咳、鼻汁	○	○	○
4	46	白痢、元気消失	○	○	○
5	52	なし	○	×	○
6	52	なし	○	×	○
7	55	発咳、鼻汁 一過性下痢	○	○	○
8	80	発咳	○	×	○

図2 3カ月齢未満の子牛症例について

症例	月齢	臨床症状	肉眼病変 有無	
			肺、肺門リンパ節	消化管粘膜
9	3	なし	×	○
10	4	なし	×	×
11	6	発育不良	×	×
12	8	なし	○	×
13	9	発育不良	×	○
14	34	なし	×	○

図3 3カ月齢以上の症例について

HE の共通する組織所見 (図 4) は、腎臓間質、脳の血管周囲への単核細胞の浸潤 (図 5) であった。3 カ月齢未満の症例では、化膿性気管支肺炎が 87.5% にみられた。消化管粘膜に潰瘍やびらんはなく、粘膜病発症個体はいなかった。

臓器	所見	子牛(%)	3ヶ月齢≤(%)	合計
腎	間質にリンパ球、単核細胞浸潤	71.4	100	11/13
脳	囲管性細胞浸潤	62.5	83.3	11/14
	化膿性気管支肺炎	87.5	16.7	8/14
肺	気管支周囲にリンパ球浸潤	62.5	33.3	7/14
	間質性肺炎	—	66.7	4/14
肝	グリソル筋リンパ球浸潤	62.5	33.3	7/14
消化管	コクシジウム、原虫寄生	20	50	5/14
	好中球、好酸球、マクロファージ浸潤	50	16.7	5/14

図4 組織所見について

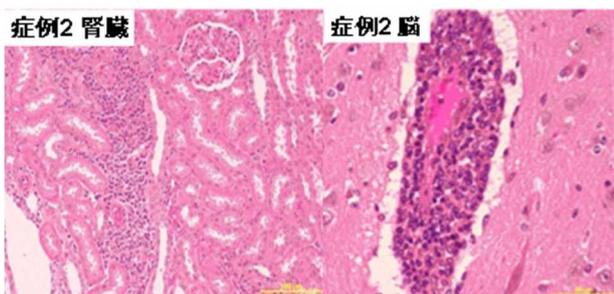


図5 脈管周囲の単核細胞の浸潤

検討2: IHCの結果(図6), 腎臓乳頭部の尿細管上皮細胞(図7), 中枢神経系の血管内皮細胞や囲管性浸潤細胞が陽性となった。浸潤細胞のうち, 陽性を示す細胞は一部であり, 反応態度も症例差があった。抗原量と組織病態に相関性なく, 反応態度については, 既報とおおむね一致した[2].

臓器	陽性細胞	子牛(%)	3ヶ月齢≤(%)	合計
	尿細管上皮	75	16.7	8/11
腎臓	血管内皮、血管周囲	12.5	33.3	2/11
	間質浸潤細胞	0	0	0/11
脳	血管内皮、血管周囲	50	75	7/12
	囲管性浸潤細胞	37.5	0	3/12

図6 IHC 結果について

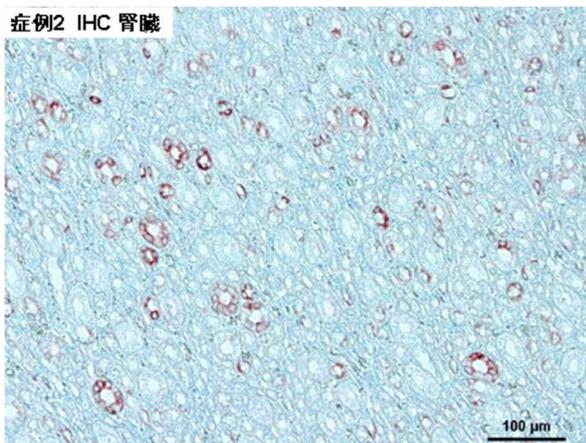


図7 腎臓尿細管上皮の陽性反応

検討3:いくつかの症例で, 非化膿性脳炎や間質性腎炎などの特徴所見がみられ, IHCの結果, BVDV抗原の存在が示唆されたが, PI牛確定症例と比較して, 陽性細胞の発現が限定的であった。

【まとめ】

PI牛は, 病変形成がみられ, 間質性腎炎や中枢神経系における囲管性細胞浸潤が共通所見であった。IHCの陽性反応の分布は, 腎臓尿細管上皮, 中枢神経系の血管内皮, 囲管性の浸潤細胞であった。これらの所見は, PI牛の可能性を示唆する。パラフィンブロックは特に極低温での保存等を必要とせず, 検査に際して検体の融解, 再凍結などがいないため長期保管が比較的容易である。また, 死後の病性鑑定などでは血液サンプルが得られない場合もあることから, 病理組織検査からBVDV感染牛の摘発が可能となれば疫学上有用な知見が得られると考える。一方, IHCの手技, 陽性の症例差については, 改良の余地がある。固定条件(死後の経過時間), IHC手技の改良やさらなる症例経験を積む必要がある。

PI牛の診断は, 臨床検査やウイルス検査結果と併せて総合的に判断することが求められる。

【参考文献】

- [1]病性鑑定マニュアル第3版
- [2]大分県家畜保健衛生並びに畜産関係業績発表会集録 58, 44-49(2009)