牛丘疹性口炎に罹患した黒毛和種子牛の1例

高橋真紀^{1)†} 清宮幸男¹⁾ 関 慶久¹⁾ 本川正人¹⁾ 熊谷芳浩¹⁾芝原友幸²⁾ 木村久美子²⁾ 播谷 亮²⁾

1) 岩手県中央家畜保健衛生所 (〒020-0173 岩手郡滝沢村滝沢字砂込390-5)

2) 飼農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2009年11月10日受付・2010年1月7日受理)

要 約

舌の腹側面および歯ぎんに丘疹性病変が多発した4カ月齢の黒毛和種子牛を病理学的およびウイルス学的に検索した。病巣は有棘層の外層および顆粒層を構成する細胞の腫大、空胞化および好酸性細胞質封入体を伴う上皮の増殖により特徴づけられた。免疫組織化学的にパラボックスウイルス抗原、また電子顕微鏡検査により同ウイルス様粒子が病巣内に観察された。ウイルス遺伝子がPCRにより病巣から検出され、PCR産物の塩基配列あるいは制限酵素断片長多型解析により牛丘疹性口炎ウイルスに分類された。以上の成績から本病を牛丘疹性口炎と診断した。

——キーワード：牛丘疹性口炎，子牛，制限酵素断片長多型解析。

日獣会誌 63, 359～363 (2010)

パラボックスウイルス属には4種のウイルス，すなわち，牛の牛丘疹性口炎ウイルス（BPSV）および偽牛痘ウイルス，羊のオルフウイルスならびにニュージーランドの赤鹿由来のパラボックスウイルスが含まれる [1]。これらのウイルスは互いに近似する抗原性を有し [2]，各ウイルス感染により誘発される病変も類似することから [3]，感染ウイルスの正確な分類には，ウイルス遺伝子の塩基配列や制限酵素断片長多型（RFLP）解析のような分子学的検索が求められる [4]。

これまでのパラボックスウイルス属ウイルス（パラボックスウイルス）の分類は，牛や羊等の発病した動物の種類および口腔や乳房等の丘疹性病変が発現した部位に基づいて行われてきたことから，感染ウイルスを分子学的に検索した野外例の報告は少ない [4]。

この報告では，牛丘疹性口炎と診断された子牛1例の病理学的およびウイルス学的検査成績を述べる。

材 料 お よ び 方 法

2007年11月に，1～10カ月齢の計130頭の黒毛和種肥育用子牛を飼養する農場で，4カ月齢の1頭に40℃の発熱および食欲不振とともに，舌の腹側面および歯ぎんに

に多発性の丘疹性病変が認められた（図1）。同病変は直径が2～20mmの円形ないし卵円形で，黄赤色を呈し，しばしばび爛あるいは潰瘍を伴っていた。同病変は約3週間後に自然治癒したが，その間，他の子牛に同様の病変は観察されなかった。生検により得た歯ぎんの病巣を病理学的およびウイルス学的に検索した。

図1 舌の腹側面に丘疹性病変が多発している。
挿入：同様の病変が歯ぎんにみられる（矢頭）。

† 連絡責任者：高橋真紀（岩手県中央家畜保健衛生所）

〒020-0173 岩手郡滝沢村滝沢字砂込390-5

☎019-688-4111 FAX 019-688-4012

E-mail : maki-t@pref.iwate.jp

図2 歯ざん。有棘層の外層と顆粒層を構成する細胞は腫大および空胞化している (HE 染色 Bar = 100 μ m)。

図4 歯ざん。パラポックスウイルス抗原が変性細胞の細胞質と封入体に存在する (IHC 染色 Bar = 50 μ m)。

図3 歯ざん。腫大および空胞化を示す変性細胞に細胞質封入体 (矢頭) が存在する (HE 染色 Bar = 20 μ m)。

図5 歯ざんの透過型電子顕微鏡像。顆粒層の構成細胞の細胞質に成熟ウイルス粒子が存在する。長径が約200～350nm、短径が100～150nmの同粒子は、ダンベル型のコアを取り囲む2層の膜より成る。
(酢酸ウラン・クエン酸鉛二重染色 Bar = 200nm)

病理学的検査：生検病巣を10%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) 染色および免疫組織化学的 (IHC) 染色を施して鏡検した。IHC 染色には市販の検査キット (ヒストファイニンシンプルスステイン AP (R), ㈱ニチレイ, 東京) ならびに一次血清として抗 BPSV (Chiba strain [5]) 家兎血清あるいは抗牛パピローマウイルス家兎血清 (Quartett GmbH, Germany) を使用した。岐阜大学の猪島康雄博士の好意により得られた前者の血清は、BPSV 以外のパラポックスウイルスと抗原学的に交差することから [6], パラポックスウイルス抗体として用いた。

ホルマリン固定後の病巣の一部を1%オスミウム酸で後固定し、エボン包埋後超薄切片を作成し、酢酸ウランおよびクエン酸鉛で染色し、透過型電子顕微鏡により観察した。

ウイルス学的検査：パラポックスウイルスの分離を目的に、生検病巣を Earl's 培養液でホモジネート後、上清

を3継代目の牛精巣細胞に接種して7日間3代の回転培養を行った。また、同ホモジネート検体から市販キット (QIAamp DNA Mini Kit (50), ㈱キアゲン, 東京) により DNA を抽出し、パラポックスウイルス遺伝子の検出に特異的な pan-parapoxvirus primer 1 (PPP-1) および PPP-4 [7] を用いて PCR を実施した。増幅産物の精製 (Montage-PCR, Millipore, U.S.A.) およびシーケンス反応 (BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, U.S.A.) をそれぞれ市販キットで行い、ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, U.S.A.) で塩基およびアミノ酸配列を分析した。同配列に近似するウイルス株を、DNA Data Bank of Japan (DDBJ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp>) の BlastN から得た DNA データベースにより検索した。

V660	131	GGGTCCGCGT	TCTTCCACTC	CGTCACGATC	ACGCGGACAC	GCACGCTGCG	GTCGATGGCC	190
Aomori	131	T.....			G..			190
Chiba	131	T.....			G..			190
Ishikawa-B	131	T.....			G..			190
Ishikawa-S	131	T.....			G..			190
V94	131	T.....			G..			190
Iwate/bovine/2007	131				G..		A...	190
V660	291	TGGCGGAGTC	GATGCGGTGC	AGCACCAGGT	CCTCGTCCAG	CGTGCGGTAG	AAGCCCAGGA	350
Aomori	291	..C.....						350
Chiba	291	..C.....						350
Ishikawa-B	291	..C.....						350
Ishikawa-S	291	..C.....						350
V94	291	..C.....						350
Iwate/bovine/2007	291	..C.....					T.....	350
V660	411	TCGCCGTTGG	CGTGATCATG	430	531	AGTACACGCC	CAGGTTCTTG	550
Aomori	411			430	531	C..		550
Chiba	411			430	531	C..		550
Ishikawa-B	411			430	531	C..		550
Ishikawa-S	411			430	531	C..		550
V94	411			430	531	C..		550
Iwate/bovine/2007	411	G..		430	531	C..		550

図6 既知の牛丘疹性口炎ウイルス6株および検索例 (Iwate/bovine/2007) のエンベロープ遺伝子の塩基配列。解析した領域 (594塩基) において7株間で相違した領域を抜粋し、V660株と同一の塩基を・で示した。既知株の塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBankのDNAデータベースから得た (V660: AB044793, Aomori: AB044797, Chiba: AB044798, Ishikawa-B: AB044800, Ishikawa-S: AB044801, V94: AB044799)。

前述のPCRにより検出されたパラボックスウイルス遺伝子を簡易に分類する目的で、Inoshimaら [4] の方法に従い、制限酵素に *Drd* I, *Xmn* I, *Pf*MI および *Hinc* II を用いて RFLP 解析を行った。

成 績

病理学的検査成績：歯ぎんに観察された組織学的変化は丘疹の特徴を有した。すなわち、重層扁平上皮は構成細胞の増殖により巣状に肥厚し、有棘層の外層および顆粒層を構成する細胞の腫大、空胞化および好酸性細胞質封入体を伴っていた (図2, 3)。これらの変性細胞に核濃縮あるいは核膜肥厚が観察された。基底層はしばしば粘膜固有層の方向に伸展し、同固有層にうっ血ならびに組織球およびリンパ球の浸潤がみられた。二次的細菌感染を伴うび爛および潰瘍が多く、病巣に存在した。

免疫組織化学的に、パラボックスウイルス抗原が有棘層の外層および顆粒層を構成する細胞に存在したが (図4)、牛パピローマウイルス抗原はいずれの病巣にも認められなかった。顆粒層を構成する細胞の電子顕微鏡検査により、ダンベル型のコアを取り囲む2層の膜より成る多数の成熟ウイルス粒子がみられた (図5)。同粒子の長径は約200～350nm、短径は100～150nmであった。この形態学的特徴はパラボックスウイルスのそれ [8, 9] に近似していた。

ウイルス学的検査成績：病巣からウイルスは分離され

なかったが、PCRにより既報 [7] のパラボックスウイルスと同様に594bpの増幅産物が得られた。同増幅産物の塩基配列 (Iwate/bovine/2007 strain; accession number AB538385) は、これまでに国内で分離された5株のBPSV (Aomori, Chiba, Ishikawa-B, Ishikawa-S, V94 strains) あるいはInoshimaら [4] によりBPSVの標準株として用いられたV660 strainのそれらと4あるいは6塩基を除いて同一であり (図6)、99.3あるいは98.9%の相同性を示した。また、得られたアミノ酸配列は前述の国内分離株および標準株と同一であった。

RFLP解析により、検索した増幅産物は既報 [4] のBPSV株と同一の切断像を示した。すなわち、増幅産物は *Xmn* I により496および98bpに切断され、他3種類の制限酵素では切断されなかった。これらの成績から、増幅されたウイルス遺伝子はBPSVに分類された。

考 察

4カ月齢の子牛の舌および歯ぎんに観察された大小さまざまな丘疹の組織学的変化は、構成細胞の腫大、空胞化および好酸性細胞質封入体を伴う上皮の増殖により特徴づけられた。病巣にパラボックスウイルス抗原および同ウイルス様粒子が存在し、病巣から牛丘疹性口炎ウイルス遺伝子が検出された。得られた成績から本病を牛丘疹性口炎と診断した。

パラボックスウイルスに感染した動物の臨床症状は、

一般に全身症状を伴うことなく軽度であるが [10, 11], 動物の免疫機能が低下した際や他の病原体による二次感染あるいは重感染を招いた際に重篤化する [12-15]. 検索例に観察された軽度の発熱および食欲不振は丘疹形成による直接的影響ではなく, 多くの丘疹病巣に観察された二次的細菌感染を伴うび爛や潰瘍によるものと推察された.

パラポックスウイルスは感染後の動物に意義ある免疫を賦与しないことから, 本病は再発し得る [16]. また, 臨床症状なしに同ウイルスに持続的に感染している牛の存在が示唆され, 牛の免疫機能が低下した際に潜伏ウイルスが活性化することも示されている [17]. 130 頭の子牛を飼養していた当農場で, 本病の発生が検索例に限られた理由は不明である. 可能性として, 本病の再発や潜伏ウイルスの活性化を促す免疫機能の低下が疑われた.

免疫組織化学的および電子顕微鏡検査により, パラポックスウイルス抗原および同ウイルス様粒子が有棘層の外層および顆粒層を構成する細胞に局限して分布していた. この結果は, 以前に羊へのオルフウイルス感染で考察されているように [18], BPSV がケラチノサイトで増殖することを示唆する.

口腔とその周囲皮膚に発現する病巣の分布から, パラポックスウイルス感染との鑑別を要する疾病に口蹄疫 [19], 粘膜病 [20], 伝染性鼻気管炎の全身型 [21] およびパピローマ [22-24] が含まれる. 上皮あるいは表皮を構成する細胞の増殖を伴うパラポックスウイルス感染 [25] は, 同細胞の増殖性変化を伴わない前三者の疾病から区別されるが, 病変が類似するパピローマ, 特に上皮性パピローマ [23, 24] との鑑別には病原学的検索が必要と思われた.

電子顕微鏡検査により病巣にパラポックスウイルス様粒子が観察されたが, 同ウイルスは分離されなかった. 丘疹性病巣から同ウイルスが分離された過去の報告では, 牛例で5継代目までの牛胎子肺細胞 [5], 羊例で初代の牛精巣細胞 [6] が用いられている. 検索例のウイルス分離に3継代目の牛精巣細胞を使用した, 牛胎子肺細胞のような他の培養細胞あるいは初代の精巣細胞を用いる必要があったかもしれない.

PPP-1 および PPP-4 を用いた PCR により病巣からパラポックスウイルスが示唆される増幅産物が得られ, RFLP 解析により同ウイルス遺伝子は簡易に BPSV に分類された. 同解析は BPSV 以外のパラポックスウイルスの分類にも有効であり [4], ウイルスが分離されなかった症例の診断やシーケンサーを保有しない施設での診断に有用な手法と思われた.

本報告で解析した遺伝子領域の塩基配列は, 1976 年から 1999 年にかけてわが国のさまざまな地域の牛およ

びニホンカモシカから分離された5株のBPSVにおいて同一であり, 同領域の高い保存性が示唆されている [4]. 今回得られたPCR産物と前述の5株の塩基配列を比較し, 4塩基の相違が認められた. 限られた遺伝子領域の比較であることから, 同PCR産物が前述の5株の変異株由来であるか否かを明らかにすることは困難である. 両者の関係を明らかにするためには, 異なる遺伝子領域の検索や他の症例を加えた詳細な検討が必要と思われる.

引用文献

- [1] Mercer A, Fleming S, Robinson A, Nettleton P, Reid H : Molecular genetic analyses of parapoxviruses pathogenic for humans, Arch Virol Suppl, 13, 25-34 (1997)
- [2] Wittek R, Herlyn M, Schumperli D, Bachmann PA, Mayr A, Wyler R : Genetic and antigenic heterogeneity of different parapoxvirus strains, Intervirology, 13, 33-41 (1980)
- [3] Ginn PE, Mansell JEKL, Rakich PM : Parapoxviral diseases, Pathology of Domestic Animals, vol. 1, Maxie MG ed, 5th ed, 665-668, Elsevier, Philadelphia (2007)
- [4] 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)
- [5] 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)
- [6] Kanou Y, Inoshima Y, Shibahara T, Ishikawa Y, Kadota K, Ohashi S, Morioka K, Yoshida K, Yamada S : Isolation and characterization of a parapoxvirus from sheep with papular stomatitis, Jpn Agric Res Q, 39, 197-203 (2005)
- [7] Inoshima Y, Morooka A, Sentsui H : Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction, J Virol Methods, 84, 201-208 (2000)
- [8] Okada HM, Okada K, Numakunai S, Ohshima K : Electron microscopy on mucosal and cutaneous lesions in contagious papular dermatitis of Japanese serow (*Capricornis crispus*), Jpn J Vet Sci, 46, 297-302 (1984)
- [9] Okada K, Fujimoto Y : The fine structure of cytoplasmic inclusions and virus particles of bovine papular stomatitis, Jpn J Vet Res, 23, 33-40 (1975)
- [10] Fraser CM, Savan M : Bovine papular stomatitis, A note on its diagnosis and experimental transmission in Ontario, Can Vet J, 3, 107-111 (1962)
- [11] Griesemer RA, Cole CR : Bovine papular stomatitis, I. Recognition in the United States, J Am Vet Med Assoc, 137, 404-410 (1960)
- [12] Bohac JG, Yates WDG : Concurrent bovine virus diar-

- rhea and bovine papular stomatitis infection in a calf, *Can Vet J*, 21, 310-313 (1980)
- [13] Jolly RD, Daniel RCW : Papular stomatitis of cattle, *N Z Vet J*, 14, 168-170 (1966)
- [14] Nagington J, Lauder IM, Smith JS : Bovine papular stomatitis, pseudocowpox and milker's nodules, *Vet Rec*, 81, 306-313 (1967)
- [15] 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)
- [16] Brown CC, Baker DC, Barker IK : Parapoxviral infections, *Pathology of Domestic Animals*, vol. 2, Maxie MG ed, 5th ed, 162-163, Elsevier, Philadelphia (2007)
- [17] Iketani Y, Inoshima Y, Asano A, Murakami K, Shimizu S, Sentsui H : Persistent parapoxvirus infection in cattle, *Microbiol Immunol*, 46, 285-291 (2002)
- [18] McKeever DJ, Jenkinson DM, Hutchison G, Reid HW : Studies of the pathogenesis of orf virus infection in sheep, *J Comp Pathol*, 99, 317-328 (1988)
- [19] Brown CC, Baker DC, Barker IK : Foot-and-mouth disease, *Pathology of Domestic Animals*, vol. 2, Maxie MG ed, 5th ed, 135-137, Elsevier, Philadelphia (2007)
- [20] Baker JC : Bovine viral diarrhoea virus : A review, *J Am Vet Med Assoc*, 190, 1449-1458 (1987)
- [21] Reed DE, Bicknell EJ, Bury RJ : Systemic form of infectious bovine rhinotracheitis in young calves, *J Am Vet Med Assoc*, 163, 753-755 (1973)
- [22] Jelinek F, Tachezy R : Cutaneous papillomatosis in cattle, *J Comp Pathol*, 132, 70-81 (2005)
- [23] Samuel JL, Spradbrow PB, Wood AL, Kelly WR : Oral papillomas in cattle, *Zentralbl Vet Med B*, 32, 706-714 (1985)
- [24] Tsirimonaki E, O'Neil BW, Williams R, Campo MS : Extensive papillomatosis of the bovine upper gastrointestinal tract, *J Comp Pathol*, 129, 93-99 (2003)
- [25] Griesemer RA, Cole CR : Bovine papular stomatitis, III. Histopathology, *Am J Vet Res*, 22, 482-486 (1961)

Bovine Papular Stomatitis in a Japanese Black Calf

Maki TAKAHASHI^{*†}, Yukio M SEIMIYA, Yoshihisa SEKI, Masato MOTOKAWA,
Yoshihiro KUMAGAI, Tomoyuki SHIBAHARA, Kumiko KIMURA
and Makoto HARITANI

** Iwate Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center, 390-5 Sunagome, Takizawa-mura,
Iwate-gun, 020-0173, Japan*

SUMMARY

Pathological and virological examinations were performed on a four-month-old Japanese Black calf developing many papular lesions on the ventral aspect of the tongue and gingiva. The lesions were characterized by epithelial proliferation with swelling, vacuolation and eosinophilic cytoplasmic inclusions in the cells composing the outer part of the prickle cell layer and granular layer. Parapoxvirus antigens and parapoxvirus-like particles were immunohistochemically and electron microscopically found in the lesions. The viral DNA detected from the lesions by polymerase chain reaction (PCR) was classified into bovine papular stomatitis virus by nucleotide sequencing or restriction fragment length polymorphism analysis of the PCR product. Based on the results, the disease was diagnosed as bovine papular stomatitis.

— Key words : bovine papular stomatitis, calf, restriction fragment length polymorphism analysis.

† Correspondence to : Maki TAKAHASHI (Iwate Prefecture Central Livestock Hygiene Service Center)
390-5 Sunagome, Takizawa-mura, Iwate-gun, 020-0173, Japan
TEL 019-688-4111 FAX 019-688-4012 E-mail : maki-t@pref.iwate.jp

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 63, 359 ~ 363 (2010)