

## 16. 牛ウイルス性下痢ウイルス持続感染牛診断における抗原エライザ法とイムノクロマト法の応用

県北家畜保健衛生所

○矢口 裕司 赤上 正貴

山下 薫 大谷 芳子

牛ウイルス性下痢ウイルス（以下、BVDV）の持続感染（以下、PI）牛の摘発は、一般的には血液を用いた2回の抗原検査及び抗体検査により診断されている<sup>1)</sup>。農場の感染源となるPI牛は、2回目の検査結果が出るまで隔離が必要となるが、感染拡大を防止するため、畜主及び臨床獣医師等からは早期の診断が望まれている。

抗原検出には、血液材料を用いた逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（以下、RT-PCR）または抗原検出ELISAキット（BVDV Ag エリーザキット、IDEXX：以下、抗原エライザ）が多く活用されている。また、近年では、福成ら<sup>2)</sup>が毛根材料を用いた免疫ペルオキシダーゼ（IPO）法によるBVDV検査手法について報告している。

そこで、本県で診断されたPI牛及び急性感染牛の材料を用いて、抗原エライザ法とイムノクロマト法によるBVDV検査をしたところ、PI牛の摘発に有用な結果が得られたため、その概要を報告する。

### PI牛と急性感染牛における抗原エライザのS-N値（判定値）

#### 1 野外のPI牛と急性感染牛の抗原エライザ値の比較

家畜伝染病予防法第5条検査により、平成26年4月から平成28年10月までに採材した牛の血清8,209検体について、当所において抗原エライザを実施した結果、陽性頭数は38頭で、その内訳はPI牛32頭（0.39%）、急性感染牛6頭（0.07%）であった（表1）。

PI牛の抗原エライザ値は、2.532～3.920の範囲で中央値は3.240であった。また、急性感染牛の抗原エライザ値は0.370～0.960の範囲で中央値は0.611であり（図1）、PI牛の抗原エライザ値は、急性感染牛よりも明らかに高い値を示し、中央値でU検定をしたところ、有意差が認められた（ $p<0.01$ ）。

#### 2 急性感染牛（実験感染牛）の抗原エライザ値の推移

（国研）農研機構 動物衛生研究部門（以下、動衛研）において急性感染のモデルとしてBVDVを実験的に感染させ、経時的にRT-PCR<sup>3)</sup>及び中和抗体検査が実施されていた牛2頭（A1, 2）について、急性感染牛の抗原・抗体の動態を調べるため、抗原エライザ及び抗体エライザ（VDPro® BVDV AB ELISA, ME

DIAN：以下、抗体エライザ) を使用して、検査を行った。

RT-PCR では、A1 は感染後 4 日目と 8 日目、A2 は 6 日目、8 日目、12 日目で陽性を示した。また、中和抗体検査では、A1 は感染後 12 日目以降、A2 は感染後 14 日目以降に抗体上昇が確認された。今回の BVDV の急性感染牛は、4～12 日目にウイルス血症を起こし、感染約 2 週間後には抗体上昇に伴って、血中からウイルスが消失していた。

一方、抗原エライザでは、A1 は、採材された全ての検体が陰性であった。A2 は、8 日目のみ陽性(抗原エライザ値 1.192) が確認された。また、抗体エライザでは、A1 は 12 日目以降、A2 は 14 日目以降に抗体を確認した。当所で行った野外検体の結果と同様に、実験感染牛の抗原エライザは、陽性になっても、その値は PI 牛の最低値 2.532 よりも低値であった。また、抗体エライザは、中和抗体に一致して 12～14 日目に陽性になった。

### イムノクロマト法と RT-PCR の比較

イムノクロマト法は、特殊な機材を必要としないため、野外でも実施することができ、短時間で結果が得られる非常に簡便な検査手法である。今回、BVDV のイムノクロマト法である IDEXX SNAP BVDV test (以下、簡易キット) の有用性について、RT-PCR の結果と比較した。

RT-PCR では、PI 牛 4 頭、急性感染牛 4 頭及び陰性対照牛 5 頭の皮膚及び毛根を材料とした。皮膚は約 0.5cm 四方に切り出し、毛根は尾根部及び耳介皮膚から約 30 本程度を用いて乳剤を作製した。それらの材料について、抽出キットを用いて RNA を抽出し、RT-PCR<sup>3)</sup> を実施した(図 3)。その結果、PI 牛 4 頭の皮膚及び毛根は、全て陽性であった。一方、急性感染牛 4 頭と陰性対照牛 5 頭の皮膚及び毛根は、全て陰性であった。

簡易キットでは、PI 牛 6 頭、急性感染牛 4 頭及び陰性対照牛 5 頭の皮膚及び毛根を材料とした。皮膚は約 1cm 四方に切り出し、毛根は尾根部の皮膚からひと摘み(約 30 本)したものを材料とした(図 2)。材料はそれぞれキット付属のコンジュゲート液 1.5ml に 10 分間浸し、得られた抽出液を簡易キットに移して、10 分後に判定した(図 3)。その結果、PI 牛 6 頭の皮膚及び毛根は、全て陽性であった。一方、急性感染牛 4 頭と陰性対照牛 5 頭の皮膚及び毛根では、全て陰性であった。

皮膚・毛根の RT-PCR では、PI 牛の抗原は検出できたが、急性感染牛の抗原は検出できなかった。また、簡易キットの結果は、RT-PCR の結果と一致したため、検出感度も RT-PCR と同等であった。

## 考察

妊娠牛が BVDV に急性感染し、その際に胎齢 125 日未満の胎子が子宮内感染すると、胎仔はその BVDV に対して免疫寛容となり PI 牛として生まれてくる<sup>4)</sup>。PI 牛の多くは発育不良が認められ、二次感染や日和見感染による肺炎などを発症し死に至ることが多い。また、PI 牛は無症状のまま農場内に長期間飼養されることで感染が拡大し、同居牛の死産を引き起こし、その経済的被害は大きい。また、発生予防対策として広く活用されている BVD ワクチンは、本病の発症予防には有用であるが、PI 牛の娩出を完全に抑える事は出来ない。

BVDV の清浄化を達成するためには、PI 牛を積極的に摘発することが重要である<sup>5)</sup>。また、農林水産省の「牛ウイルス性下痢・粘膜病対策ガイドライン」では、PI 牛を隔離指導したうえで、3 週間間隔の 2 回検査で確実な診断を行うことを推奨している。しかし、PI 牛は、その間に大量のウイルスを排泄し、同居牛の感染源となることから、畜主や臨床獣医師からより早期の診断が望まれている。

当所で摘発した PI 牛の抗原エライザの値は、急性感染牛より明らかに高く有意差が認められたことから、抗原エライザ値が 2.5 以上であれば高い確率で PI 牛を特定できることが示唆された。

実際の PI 牛検査は、バルク乳の抗原検査や余剰血清の抗体検査の結果から、農場内に PI 牛が飼養されている可能性が示唆されることが多い。そして、PI 牛の特定は、全頭の血液を使った、抗原エライザ検査が実用的であり、省力的でもある。急性感染牛はエライザ値が低く、PI 牛では高値を示すため、1 回目検査時点で、PI 牛と急性感染牛を判別することが可能であった。

また、簡易キットは、海外では耳標を装着する際の耳パンチで生じる耳介皮膚組織片を材料とし、入牧牛や導入牛の BVDV 検査を行っている。今回、この簡易キットを当所が代理店を通じて個人輸入し、早期診断の検査手法として実用性を検討した。

皮膚・毛根を用いた RT-PCR は、PI 牛だけが陽性になることが今回の検討でも明らかになった。過去の報告<sup>6)</sup>においても急性感染牛の皮膚では BVDV 抗原は検出されていない。そのため、皮膚・毛根を材料とした抗原検査は、PI 牛の摘発に有効であることが分かった。また、簡易キットでも、RT-PCR と同様に PI 牛のみ陽性を示す結果が得られたことから、簡易キットは抗原を検出するのに十分な感度を有していたと判断できる。

また、この簡易検査は、原則、皮膚組織を用いて検査するになっているが、毛根でも皮膚組織と同等の感度があることが確認できた。簡易キットを実際に農場で使う場合、皮膚組織を採取するよりも採材が簡便であり、牛の遺伝子病診断や親子判定でも活用されている毛根で検査できれば、より臨床現場で活用し易い検査法となる。

PI牛を摘発した農場では、その後の出生子牛や導入牛のBVDV検査が継続的に必要となる。簡易検査は非常に簡便であり、採材後、約20分で判定できるため、PI牛を検査当日に特定し、隔離飼育などのウイルス拡散防止対策を取ることが出来る。また、併せて血液も採取し、抗原エライザ値が2.5以上の高値であれば、PI牛を確実に特定することができ、早期に隔離飼育を行うことで、BVDVの拡散を防ぐことができる。

出生直後の子牛は、初乳からの移行抗体が抗原を捕足するため、抗原エライザで陰性もしくは低い判定値を示す可能性がある<sup>7)</sup>。しかし、毛根を用いた簡易検査では移行抗体の影響を受けにくいため、PI牛を特定する目安になる。今後、簡易キットが移行抗体を保有するPI初生子牛においても有用かどうか、検討を重ねていきたい。

稿を終えるにあたり、検査にご尽力及びご助言いただいた（国研）農研機構動物衛生研究部門 川畷健司先生、亀山健一郎先生に深謝致します。

## 参考文献

- 1) 農林水産省消費・安全局監修，病性鑑定マニュアル第4版，68-70
- 2) 福成ら，毛根を用いた牛ウイルス性下痢ウイルスの簡易検査法の確立，全国業績発表会，2015
- 3) Vilcek S et al., Arch Virol, 136, 309-323, 1994
- 4) 田島ら，牛ウイルス性下痢ウイルス感染症，日獣会誌，65, 111-117, 2012
- 5) 斎野ら，牛ウイルス性下痢ウイルス感染症の地域的な対策事例と効果の検証，日獣会誌，66, 791-796, 2013
- 6) Brad L. Njaa et al., J Vet Diagn Invest, 12, 393-399, 2000
- 7) 増田ら，新たに市販された抗原ELISAを用いた牛ウイルス性下痢ウイルス検査の検証，日獣会誌，69, 187-191, 2016



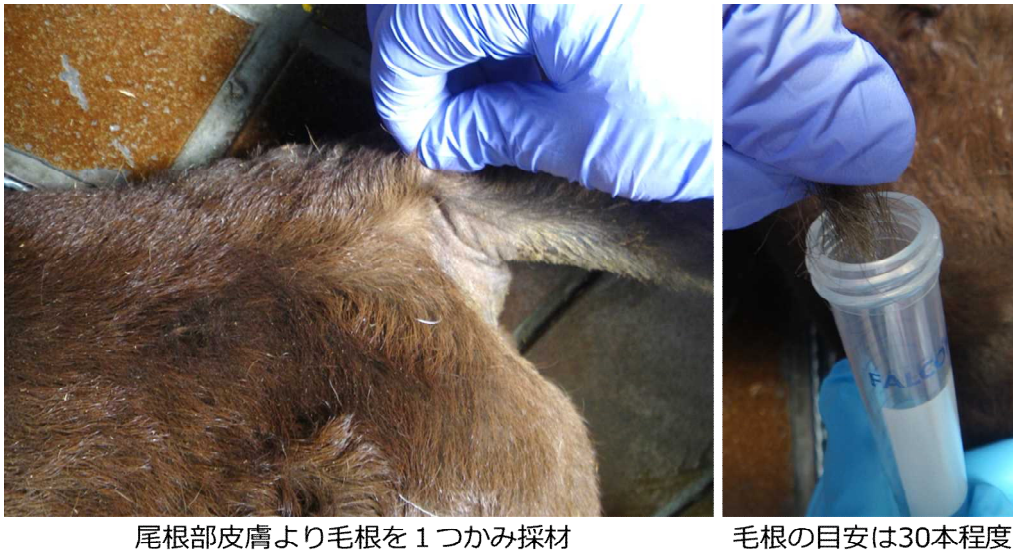


図2 毛根材料の採材の様子

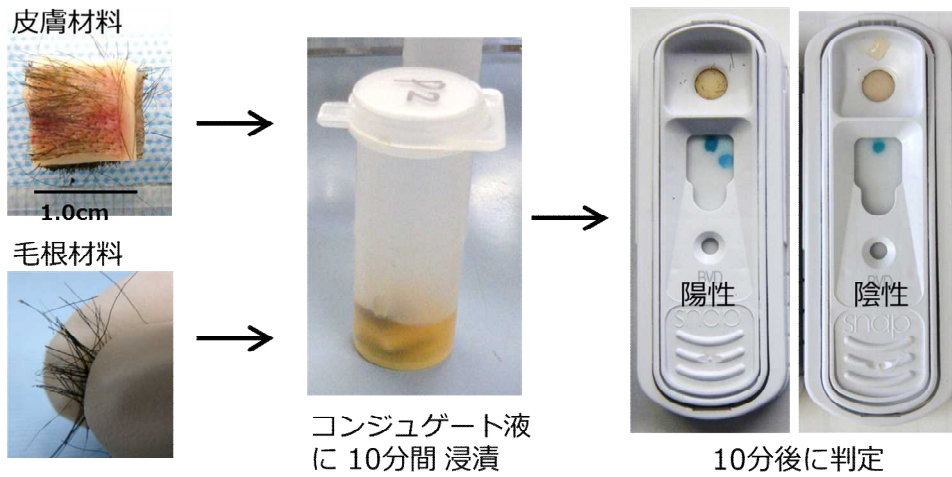


図3 イムノクロマト法の材料と方法

表3 イムノクロマト法の検証結果

No.	月齢	抗原エライザ		簡易キット		RT-PCR		
		血清(1回目)	血清(2回目)	毛根	皮膚	毛根	皮膚	
PI 牛	1	17日齢	+ 2.670	+ 2.560	+	+	+	+
	2	66か月齢	+ 3.940	+ 3.920	+	+	NT	NT
	3	63か月齢	+ 3.390	+ 3.920	+	+	NT	NT
	4	58日齢	+ 3.429	+ 3.590	+	+	+	+
	5	48日齢	+ 3.414	+ 3.600	+	+	+	+
	6	35か月齢	バルク乳 PCR +	+ 3.900	+	+	+	+
急性 感染 牛	1	実験感染牛	- 0.027	- 0.000	-	-	-	-
	2	実験感染牛	+ 1.196	- 0.023	-	-	-	-
	3	5か月齢	+ 0.487	- 0.090	-	NT	-	NT
	4	7か月齢	+ 0.734	- 0.100	-	NT	-	NT
陰性 対照	1	76か月齢	- 0.010	NT	-	-	-	-
	2	74か月齢	- 0.001	NT	-	-	-	-
	3	59か月齢	- 0.010	NT	-	-	-	-
	4	90か月齢	- 0.003	NT	-	-	-	-
	5	79か月齢	- 0.001	NT	-	-	-	-

## 17. 細菌性血色素尿症と慢性銅中毒の複合的傷害により発症した血色素尿牛 3 症例

県北家畜保健衛生所

○藤井 勇紀 矢口 裕司  
赤上 正貴 大谷 芳子

牛の細菌性血色素尿症（Bacillary Hemoglobinuria：以下 BHU）は偏性嫌気性菌 *Clostridium haemolyticum*（以下，Ch）の経口摂取後，肝実質損傷による嫌気条件下での菌増殖により，大量の溶血毒素が放出されることで，発熱・黄疸・血色素尿を呈し 1～2 日で死亡する疾病である<sup>1,2,3,4)</sup>。一方，慢性銅中毒は，銅の少量長期摂取で肝臓に銅が蓄積し，銅が急激に血中放出されると，銅の触媒作用（Fenton 反応）で産生される活性酸素種の細胞傷害により，BHU とよく似た症状及び経過を示す<sup>5,6,7)</sup>。

今回，これら 2 疾病の複合的な関与により血色素尿を発症した牛の 3 症例について，病性鑑定を行ったのでその概要を報告する。

### 発生状況

管内の乳肉複合の一貫経営農場（肉用種：400 頭，乳用種：120 頭）において，2016 年 1 月～4 月に，約 10 か月齢の肉用肥育牛が可視粘膜黄疸・血色素尿を呈する事例が P1～P3 の 3 例発生したため病性鑑定を実施した。なお P1,P2 は急性経過で死亡後の死体解剖，P3 については予後不良のため鑑定殺を実施した（表 1）。

### 材料と方法

血色素尿発症牛（以下，発症牛）3 頭（P1～P3）と，他疾病で鑑定殺をした同農場の非発症牛 1 頭（N1）の主要臓器，血液，また同居牛（乳用牛 26 頭，肉用肥育牛 54 頭）及び他農場牛（乳用牛 30 頭，肉用肥育牛 29 頭）の血液，発生農場環境の材料を検査に供した。

#### 1 細菌学的検査

##### （1）培養検査

P1～P3，N1 の主要臓器・血液について，5%めん羊血液寒天培地，DHL 寒天培地を用いた，37℃48 時間の好気培養及び嫌気培養（ガスパック法）を実施した。

なお，P1～P3，N1 の肝臓，腎臓，血液については，Ch 等の偏性嫌気性菌をターゲットに，脱酸素クックドミート培地での増菌後，ガス噴射法による嫌気培養を実施した。培養後の生育菌については 16srRNA 解析，または菌種特異的な PCR と増幅産物のシーケンスにより基準株との相同性を比較した。



## (2) 遺伝子検査

P1~P3, N1 の肝臓, 腎臓, 血液から, ヨーネピュアスピン (株) ファスマック) を用いた DNA 抽出を行い, *C. Novyi* A 型及び B 型, *C. septicum*, *C. chauvoei* のマルチプレックス PCR, Ch の Nested PCR<sup>4)</sup>, *C. botulinum* C 型及び D 型の PCR を実施した。また, 腎臓については, レプトスピラ属菌の PCR も併せて実施した。また増幅産物のシーケンスにより基準株との相同性比較を実施した。

## (3) 環境材料の Ch 培養検査

発生農場において, 平成 28 年の 2 月と 10 月に採材した同一箇所の環境材料及び対照として採材した他の肉用牛飼養農場と当所の庭の土の各 1 g を脱酸素クックドミート培地で増菌・DNA 抽出後, Ch の Nested PCR を実施した。

## 2 生化学的検査

### (1) 肝臓・血清の銅濃度測定

P1~P3, N1 の肝臓について, 銅濃度測定を (国研) 農研機構動物衛生研究部門 (以下, 動衛研) に依頼した。また, P2 (発症時), P3 (発症前, 発症時), N1 (解剖 1 か月前, 解剖時) と同居牛及び他農場牛の血清について, 銅測定 LS (株) メタロジェニクス) を用いた銅濃度測定を実施した。

### (2) 血液生化学検査

P2, P3, N1 の血清について, 定法に従い血液生化学検査を実施した。

## 3 病理組織学的検査

P1~P3, N1 の主要臓器について定法に基づき薄切切片を作成後, HE 染色を実施した。また, 肝臓についてはロダニン染色を実施した。

## 4 ウイルス学的検査

P1~P3, N1 の主要臓器を用いて, 定法に従い実施した。

## 成績

### 1 細菌学的検査

#### (1) 培養検査

好気培養, ガスパック法による嫌気培養では有意菌は分離されなかった。

ガス噴射法による培養で, P2 の肝臓, 血液, P3 の肝臓からグラム陽性の遊走性大桿菌が生育した。生育菌について Ch の PCR を実施したところ, P2 の血液, P3 の肝臓で Ch の特異遺伝子が検出された (いずれも相同性 99%)。また P2 の肝臓, 血液で *C. Novyi* A 型が分離された。N1 からは有意菌は分離, 検出ともに陰性であった。

#### (2) 遺伝子検査 (表 2)

P1, P2 の肝臓・血液から Ch の特異遺伝子を検出した (P2 肝臓で相同性 99%)。N1 の材料からは特異遺伝子は検出されなかった。

### (3) 環境材料の Ch 検査 (表 3)

2 月検査で P2 飼養区画の飼槽ホコリの増菌液から Ch の特異遺伝子を検出した (相同性 99%)。なお飼槽の消毒実施後, Ch の特異遺伝子は検出されなかった。

## 2 生化学的検査 (表 4, 図 1~3)

### (1) 肝臓・血清の銅濃度測定

P1~P3, N1 とともに肝臓では正常値を上回る値 (221~340 $\mu\text{g/g}$ ) を示した。P2, P3 の発症後血清でも正常値を上回る値 (969.7 $\mu\text{g/dl}$ , 909.0 $\mu\text{g/dl}$ ) を示し, 特に P3 は発症前 (120.9 $\mu\text{g/dl}$ ) と比較し, 急激な値の上昇を示した (図 1, 2)。N1 においては解剖一ヶ月前の血清で正常値であり, 解剖時血清でも数値の大きな変動はなかった。同居牛と他農場牛の血清では, 図 3 に示す通り, 中央値が同居では肉用肥育牛で 138.8, 乳用牛で 118.7, 他農場は肉用肥育牛で 108.1, 乳用牛で 110.9 であり, 同居肉用肥育牛で最も高かった。また同居肉用肥育牛とその他 3 牛群の分布に有意差がみられた (Steel Dwass 検定:  $P < 0.05$ )。

### (2) 血液生化学検査

P2, P3 では黄疸・血色素尿の発症後に T-Bil, GGT の急激な上昇を示した。それに対し, N1 については GOT, GPT, LDH の値は正常範囲を超えていたが, T-Bil, GGT に上昇はみられなかった。

## 3 病理組織学的検査 (表 4)

P3 では肝臓のび慢性小葉中心性の肝細胞壊死が認められたが, P1,2 では死後変化により病変は確認できなかった。N1 の主要臓器では, 病変は認められなかった。肝臓のロダニン法では, P1~P3, N1 でロダニン陽性を示す顆粒が認められた。

## 4 ウイルス学的検査結果

いずれの症例においても, ウイルスは分離されなかった。

## 考察

細菌学的検査で, 発症牛である P1, P2 の血液, P3 の新鮮肝臓において Ch の特異遺伝子が検出されていることから, 発症牛 3 頭は BHU を発症していたものと考えられた。しかし一般に Ch は正常な肝臓で増殖することではなく, 肝蛭, 肝生検, *Fusobacterium* 属菌による肝膿瘍など, 何らかのストレスによる機械的な肝実質傷害で嫌気条件が整ったときのみ増殖する偏性嫌気性菌である。このため, 本事例でも Ch 増殖を起こす何らかのストレスの検索が必要であった。発症牛 3 頭の肝臓の銅濃度は高値であり, ロダニン染色で銅の沈着も確認がされたことから, 銅に起因する活性酸素種が肝臓の細胞傷害を起こしていたことが推察された。これが Ch 増殖のストレスとなり, BHU の発症に至ったものと考えられた。

一方, 発症牛の P2, P3 は血色素尿の発症時に血中銅濃度・肝機能数値が急激に上昇しており, これは肝臓に蓄積された銅が急激に血中放出されることで発症

に至る慢性銅中毒の病態と一致しており、BHU との併発している可能性が示唆された。一般的に、牛は成牛になるにつれて、銅に対する耐性が強くなるため、肝機能低下やストレスなどのトリガーがなければ慢性銅中毒の発症に至ることはない<sup>5)</sup>。また、慢性銅中毒発症時の肝臓の銅濃度も一般に 500~2000 $\mu\text{g/g}$  とされている。しかし本事例ではそこまでの値に至っておらず、非発症牛の N1 では銅濃度が肝臓で高く、血中では低いことから、発症牛は単純な銅摂取のみではなく、何らかのトリガーによって銅の血中放出がされたものと思われた。同居牛では肉用肥育牛 54 頭の血液で銅濃度が有意に高く、N1 の肝臓でも正常値を上回っていたことから、肉用肥育牛全体が急性中毒には至らないものの、銅を長期的に摂取、蓄積していた可能性が高い。そのうえで Ch が発症牛 3 頭のみから共通に検出され、非発症牛からは検出されなかったこと、また、飼槽の洗浄後は新たな発症牛がみられていないことから、Ch 感染が銅の血中放出のトリガーとなった可能性が考えられた。なお、銅の肝臓への蓄積については、現在原因を究明中である。また発症牛では P1 のみ血中銅濃度は測定されていないが、肝臓の銅濃度値が高いこと、また血液から Ch が検出されていることから、P2,P3 と同様の病態により死亡したことが推察される。以上の内容から、今回の発症牛 3 頭の事例においては、肝臓の銅沈着をストレスサーとした BHU と、BHU をトリガーとした慢性銅中毒の複合的傷害により発症した黄疸・血色素尿症であると診断した。慢性銅中毒の発生機序、また BHU との関連性については未だ不明な点が多いため、さらに知見を積み重ねていき、詳細の解明につなげたい。

稿を終えるにあたり、肝臓の銅濃度測定を実施して頂いた宮本亨先生（動衛研）、Ch に関する細菌学的検索についてご指導を頂いた、大和修先生（鹿児島大学）、高木光博先生（山口大学）、佐々木貴正先生（動物医薬品検査所）に深謝いたします。

## 引用文献

- 1) 前出吉光ら、主要症状を基礎にした牛の臨床、北海道協同組合通信社
- 2) Janzen.ED et al, Bacillary hemoglobinuria associated with hepatic necrobacillosis in a yearling feedlot heifer, Can Vet J, 22, 393-394, 1981
- 3) M.Takagi et al, Successful Treatment of Bacillary Hemoglobinuria in Japanese Black Cows, J Vet Med Sci, 71(8), 1105-1108, 2009
- 4) Y.Shinozuka et al, Bacillary Hemoglobinuria in Japanese Black Cattle in Hiroshima, Japan: A Case Study, J Vet Med Sci, 73(2), 255-258, 2011
- 5) 家畜感染症学会, 子牛の医学, 緑書房
- 6) 松本裕一ら, 周産期に多発したサフォーク種繁殖羊の慢性銅中毒, 日獣会誌
- 7) 田中ら, 銅中毒発症牛の肝細胞傷害機序における活性窒素種の関与について

表 1 血色素尿の発症牛及び非発症牛の状況一覧

血色素尿の発症	個体番号	品種	月齢	発生日 (H28)			検査材料		抗菌剤治療歴	発生状況・備考
				発症	死亡	解剖	主要臓器	血液		
	P1	黒毛和種	7か月	1/14	1/16	1/18 (死体)	○	○	有	1/14 食欲低下, 血色素尿 抗菌剤・輸液による治療開始 1/15 採血で溶血を確認 1/16 PM9:00 死亡
発症牛	P2	黒毛和種	9か月	2/24	2/28	2/29 (死体)	○	○*	有	2/24 起立不能, 食欲低下, 発熱 (38.7℃) 採血で溶血を確認, 抗菌剤・輸液治療開始 2/26 体温が若干低下 (38.0℃) 起立可能になり採食行動を確認。血色素尿継続 2/28 死亡
	P3	黒毛和種	10か月	4/1	予後不良	4/4 (生体)	○	○	有	4/1 食欲低下, 発熱 (38.8℃), 血液溶血なし GOT値は9354。抗菌剤・輸液治療開始。 4/4 可視粘膜の貧血, 黄疸確認 予後不良と判断し, 家保で鑑定殺
非発症牛	N1	黒毛和種	10か月		予後不良	4/15 (生体)	○	○	無	4/15 起立不能のため鑑定殺を実施。 臀部, 大腿部筋肉の壊死と慢性炎症が見られたが, 感染症の所見はなく, 物理的要因による起立不能

表 2 細菌培養検査と遺伝子検査結果

方法	菌名	発症牛						非発症牛	
		P1		P2		P3		N1	
		肝臓	血液 (治療後)	肝臓	血液 (治療前)	血液 (治療後)	肝臓	血液 (治療後)	肝臓
培養検査	<i>C. novyi</i> A型		NT	+	+				
	<i>C. haemolyticum</i>		NT		+		+		
遺伝子検査	<i>C. novyi</i> A型		NT						
	<i>C. novyi</i> B型		NT						
	<i>C. septicum</i>		NT						
	<i>C. chauvoei</i>		NT						
	<i>C. haemolyticum</i>	+	+	+	+				
	<i>C. botulinum</i>		NT						

※空欄は陰性。

※\*は鹿児島大学で実施。

表 3 Ch 環境検査

農場	採取場所	2月	10月
発生農場	P2飼養区画の敷料	—	—
	P2飼養区画の飼料	—	—
	P2飼養区画の飼槽ホコリ	+	—
	備蓄オガ粉 (2検体)	—	—
	ハッチ舎周辺の土壌	—	—
	放牧場土壌 (4検体)	—	—
他の和牛飼養農場	放牧場土壌 (2検体)	NT	—
	牛舎周辺土壌 (3検体)	NT	—
家保	土壌 (3検体)	NT	—

表 4 肝臓・血液の生化学検査と肝臓病理所見

個体	肝臓				血液										
	解剖日 (H28)	Cu (μg/g)	ロダニン染色	HE染色	採血日 (H28)	Cu (μg/dl)	T-Bil (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	LDH (IU/l)	GGT (IU/l)	ALP (IU/l)	Alb (g/dl)	BUN (mg/dl)	Cre (mg/dl)
P1	1/18	221	++	死後融解											
P2	2/28	284	+	死後融解	1/18		<0.1	351	22			189			21.5
					2/26	969.7	19.6	800	59		188		63.3		
P3	4/4	340	+++	小葉中心壊死	1/18		<0.1	153	27			21			22.1
					2/26		<0.1	151	26		50		17		
					3/8		<0.1	107	27		30		14.2		
					3/15	120.9	0.2	72	12	1003	39	614	3.6	13	1.1
					4/4	909.0	7.8	>2000	10	>2000	308	1326	4.2	13	2.1
N1	4/15	244	++	病変なし	3/18	125.4	<0.2	189	12	1438	136	545	3.4	12	0.9
					4/15	153.6	0.2	611	257	>2000	28	159	2.7	8	1.1
正常値		20 ~30				70 ~150	0.01 ~1	50 ~90	14 ~38	692 ~1445	6.1 ~17.4	0 ~448	3.1 ~5	10 ~18	0.5 ~1.5

※空欄はNT

※■は正常値の上限を超えた値

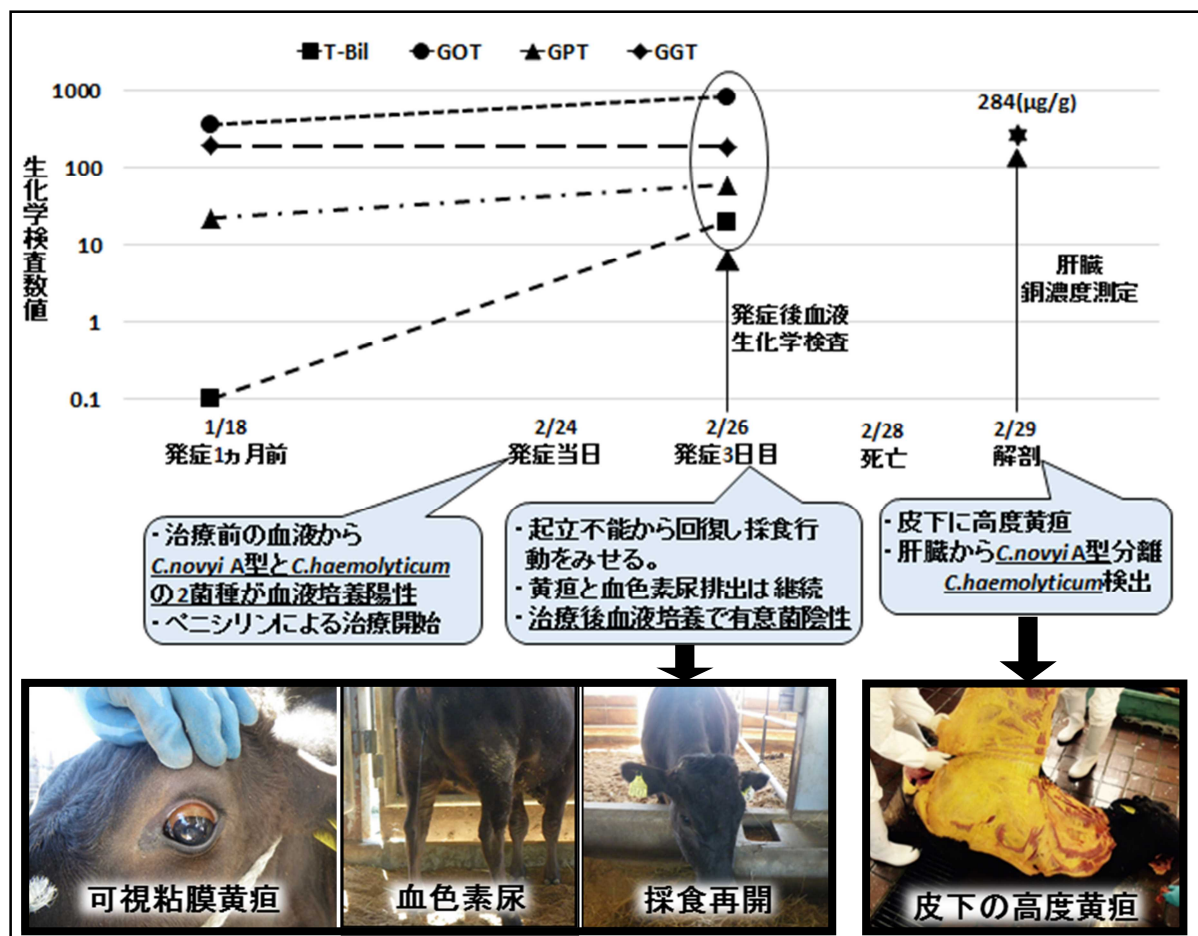


図 1 血色素尿を発症した牛 (P2) の臨床経過

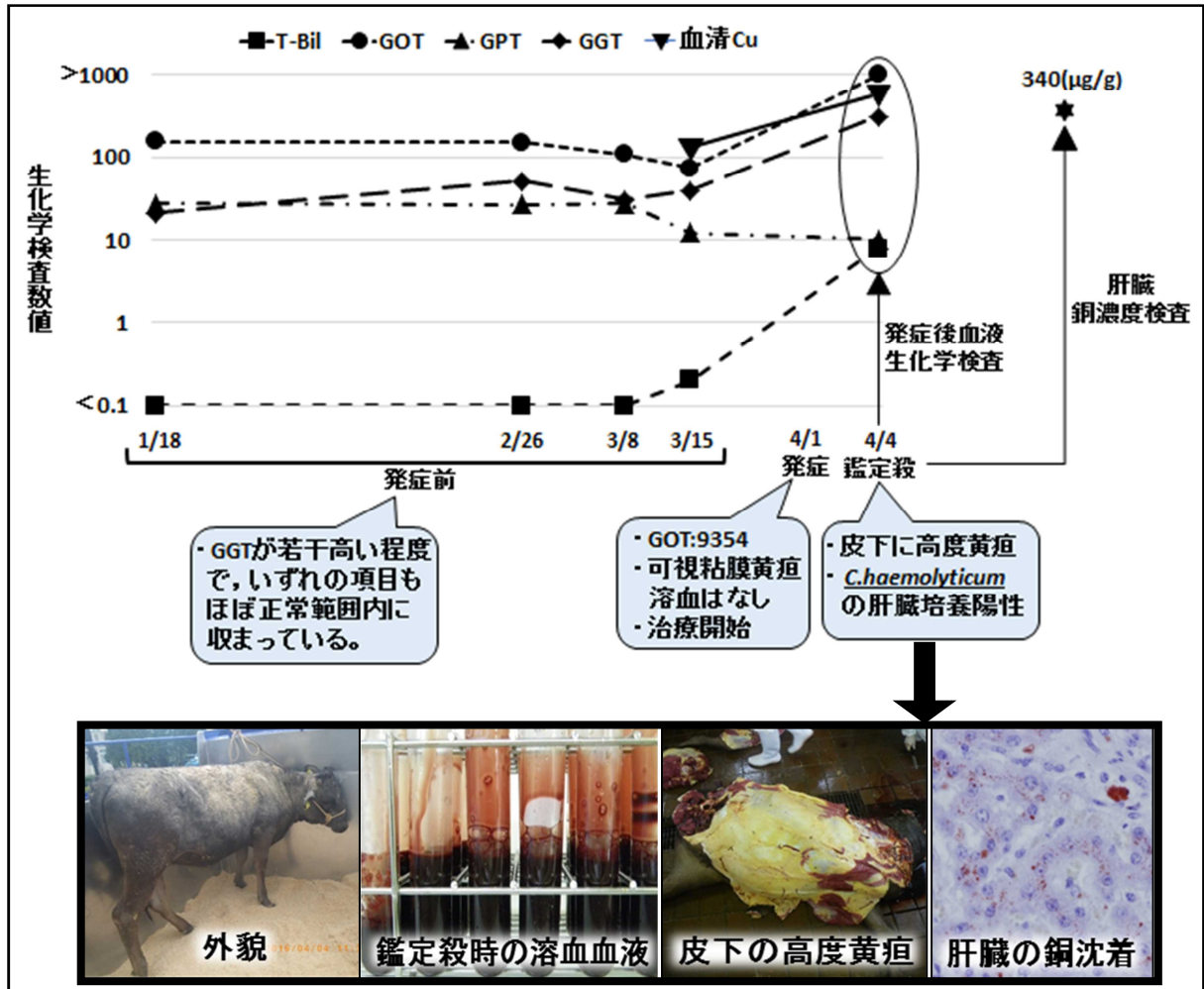


図2 血色素尿を発症した牛 (P3) の臨床経過

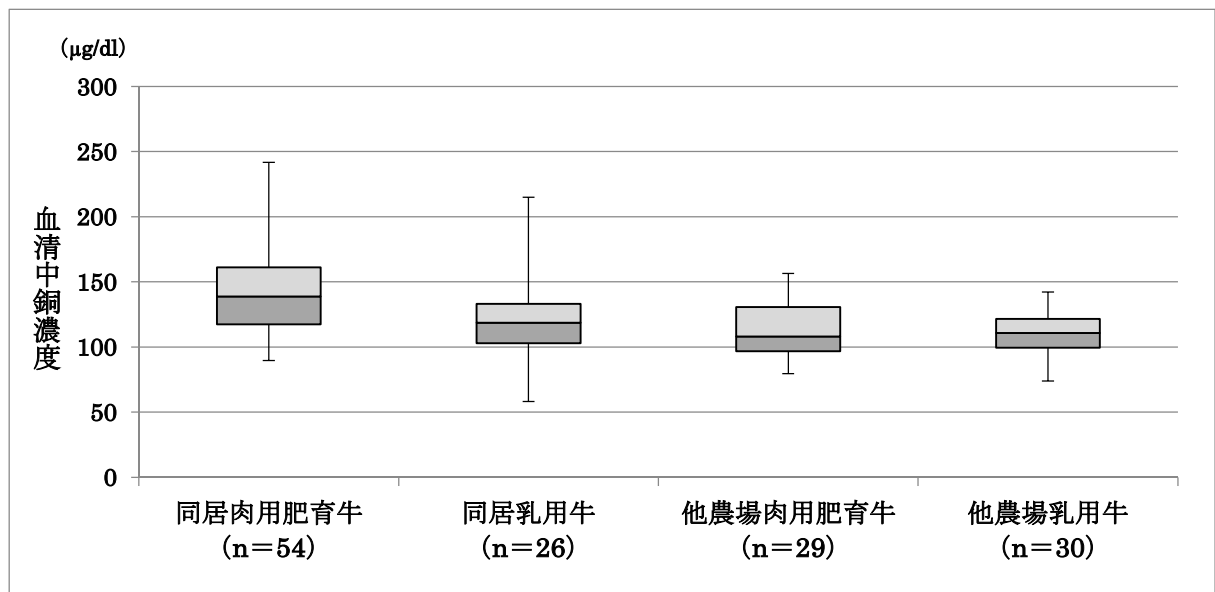


図3 同居牛及び他農場牛の血清中銅濃度のボックスプロット

## 18. 豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス（PRRSV）の遺伝子解析

県北家畜保健衛生所

○山下 薫 木村 将士  
都筑 智子 飯島 知一

### はじめ

PRRSV は、遺伝子変異を起こしやすいことから、多様な株が存在する。本県では、1993年以降に PRRSV の侵入が確認されているが、今回、PRRSV のコントロールの一助とするため、これまでに県内で検出した PRRSV 株について、遺伝子学的解析を行ったので、その概要を報告する。

### 材料及び方法

#### 1 材料

2008年から2016年に採材した豚の血清12戸644検体、2012年から2016年に呼吸器症状、死亡、発育不良で病性鑑定を実施した豚の肺乳剤35戸97検体、繁殖障害で病性鑑定に供した豚胎仔等の乳剤10戸85検体について検査を実施した。

#### 2 遺伝子解析

市販のキットを用いて RNA を抽出し、Kono らの型別PCR（以下、型別PCR）を行った。このうち、PRRSV 特異遺伝子陽性であった検体の一部を、（国研）農研機構動物衛生研究部門（以下、動衛研）に依頼し、PRRSV の Open Reading Frame5（以下、ORF5）を増幅するプライマーを用いた RT-PCR を行い、増幅された遺伝子断片についてダイレクトシーケンスにより得られた塩基配列情報を既知のデータと比較した。さらに、各農場の代表的な株を用いて分子系統樹を作成し、各株をクラスターⅠ～Ⅴに分類した。なお、クラスターⅣについては、Ⅳa、Ⅳb に細分化した。

#### 3 制限酵素処理による検出株の分類

##### （1）制限酵素断片長多型

遺伝子解析を実施した一部の検体について、Wesley らの方法<sup>1)</sup>に従いプライマーペア P420/P640 用いた RT-PCR を実施した。得られた増幅産物を制限酵素 *Mlu* I、*Hinc* II、*Sac* II で切断し、切断パターン（以下、RFLP パターン）を3桁のコードで示した。

##### （2）クラスターⅣグループ Ka 型別PCR法

クラスターⅣb に分類された検体について、型別PCRで得られた増幅産物を制限酵素 *Hinf* I で切断し、九州地方で検出された PRRSV 株との簡易識別を実施した。

## 結果（図1）

型別PCRの結果、PRRSV 特異遺伝子は30戸の農場から検出され、その内訳は、血清11戸85検体、肺乳剤22戸51検体、流産胎仔の肺乳剤1戸2検体、虚弱子豚の肺乳剤1戸7検体、胎盤乳剤1戸1検体であった。このうち81検体を遺伝子解析に供した。

### 1 茨城県内における PRRSV 分布状況

分子系統樹解析によるクラスター分類の結果、クラスターⅡ、Ⅲ、Ⅳ a、Ⅳ b、が検出されたが、クラスターⅠ及びⅤは検出されなかった。

PRRSV 特異遺伝子が検出された年度について、2008年～2010年を1期、2011年から2013年を2期、2014年～2016年を3期に区分し、検出されたクラスターを比較した。クラスターⅢは、全ての期間で検出され、1期7戸（78%）、2期8戸（53%）、3期10戸（45%）と推移した。一方、クラスターⅣ a は、1期1戸（11%）、2期2戸（13%）、3期4戸（18%）、クラスターⅣ b は、2期2戸（13%）、3期2戸（9%）から検出された。どのクラスターにも分類されない株（以下、未分類株）は2期2戸（13%）、3期2戸（9%）から検出された（表2）。

地域別に分類すると、県北12戸、鹿行7戸、県南1戸、県西10戸で、クラスターに地域の偏りはなかった。また、直線距離1km以下の3組の近隣農場間（農場No.3とNo.29、農場No.25とNo.26、農場No.7とNo.20）で同じクラスターに属し、遺伝子系統が同じ株が検出された（図2）。

### 2 クラスター別の特徴と分布状況

#### （1）クラスターⅡ

弱毒生ワクチン株が属するクラスターⅡは、ワクチン接種歴のない6戸から検出され、検出株とワクチン株との相同性は91.5～99.0%であり、発育不良豚から検出された1戸を除いて臨床症状はなかった。

#### （2）クラスターⅢ

国内標準株（EDRD-1株）や県内初分離株（ibaraki93株）が属するクラスターⅢは、今回、最も多い17戸から検出された。このうち9戸は呼吸器症状や急死の臨床症状があり、他の8戸は臨床症状を伴わなかった。

#### （3）クラスターⅣ a

国内では主に本県と千葉県で検出されているクラスターⅣ a は、6戸から検出された。そのうち2戸は、2015から2016年に死流産や哺乳豚の死亡が多発しており、その相同性は96.8%であった。このうち1戸はPRRSV 清浄農場であった。

#### （4）クラスターⅣ b

北米強毒株のNADC30株が属するクラスターⅣ b は、隣接する2戸から検出さ



れた。これらの農場では、繁殖障害や呼吸器症状等の原因究明のため、複数回病性鑑定を行っていた。検出株と NADC30 株の相同性は 94.6～96%であった。

### 3 同一農場由来株の比較

複数年にわたって検査を実施した10戸中5戸では、同一のクラスターに分類される株が検出された。他の5戸（農場No.3, 6, 7, 10, 12）では、調査期間中に異なるクラスターの2株が検出され（表1）、農場No.6ではクラスターⅢとⅣaに属する株（相同性：86.6～87.2%）、農場No.10ではクラスターⅢに属する株と未分類株（相同性：91%）が同時期に混在し、農場No.10では同じ豚舎から異なる株が検出された。

### 4 RFLP パターンの比較

#### （1）制限酵素断片長多型

RFLP は21戸50検体で実施し、遺伝子が検出された8戸23検体について RFLP パターンを分類した。EDRD-1 株と同じ切断パターン【1-4-4】を示した株は4戸22株で、ワクチン株と同じ切断パターン【2-5-2】を示した株は1株であった。ワクチン株と同じ RFLP パターンの1株のワクチン株との相同性は99%であった（表3）。

#### （2）クラスターⅣグループ Ka 型別

2戸17検体について検査を実施したが、全ての株で first PCR 産物、nested PCR 産物ともに切断されなかった。

## まとめ

本県には約500戸の養豚場があり、多くの農場ではこれまでの検査で PRRSV 抗体が確認されていることから、PRRSV は県内に広く浸潤していると考えられていた。今回、30戸から検出された PRRSV 特異遺伝子についてクラスター分類を行ったところ、県内に浸潤している PRRSV はクラスターⅡ、Ⅲ、Ⅳであることが判明し、その分布に地理的な偏りはみられなかった。

病性鑑定材料から PRRSV 特異遺伝子が検出された21戸では、クラスターの違いによる臨床症状に差はみられなかったため、PRRS の病態は感染ステージや複合感染した病原体の影響を受けるものと考えられた。一方、EDRD-1 株が属するクラスターⅢは、1期では県内の流行株の主要な株であったが、2期以降はクラスターⅣa、Ⅳb、未分類株が増加しており、県内の流行株が変化していることが見てとれた。PRRSV は豚の導入や車両の往来など、あらゆる侵入リスクが想定される。他の地域からの新たな PRRSV の侵入や、変異による株の多様化も推察されることから、今後も PRRS の発生状況に注意が必要と考えられた。

6戸（3組）の近隣農場間で同一のクラスターに属する株が検出されたことから、PRRSV の近隣伝播が疑われた。また、PRRS ワクチン未接種農場から、ワ

ワクチン株と相同性99%の株が検出された。このワクチン未接種農場の隣接農場では PRRSV ワクチンを使用しており、ワクチン株でも近隣伝播する可能性が考えられた。

クラスターIV a が検出された農場6戸のうち2戸は、1戸は清浄農場、1戸は PRRSV 浸潤農場で、両農場とも死流産や子豚の呼吸器症状が多発していた。一方、クラスターIV b の検出された2戸は PRRSV の浸潤農場であったが、死流産や子豚の発育不良が毎年繰り返されていた。一般的に PRRSV 浸潤農場で発症が認められる場合、新たな株の侵入が考えられるが、この2戸から検出される株は、同一クラスターの株であった。クラスターIV b には北米強毒株が属しており、他のクラスター属する株と比較し病原性が高いとの報告もあるため、今後、このクラスターIV b の検出状況を注視したい。

異なる2つのクラスターに属する株の浸潤が5戸で確認でき、うち2戸では同時期に2つのクラスターに属する株が侵入していた。複数株の侵入は病態を悪化させるとの報告もあり、このような農場ではまん延防止対策が急務である。また、農場 No.10 の2株（相同性91%）は、同一豚舎から検出されていることから、特に農場防疫を徹底する必要がある。

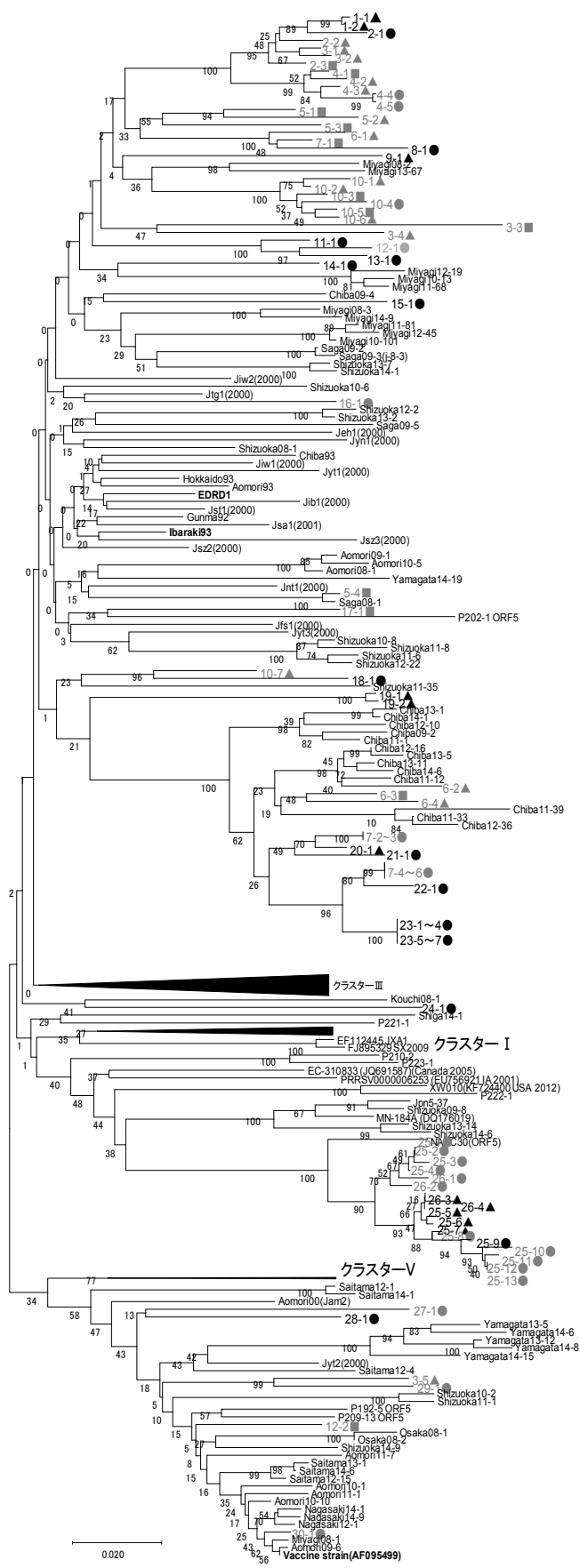
PRRSV 株の簡易識別法として RFLP を検討した。PCRで遺伝子が増幅された検体の85%が同じ RFLP パターン【1-4-4】を示したが、これらの株が属するクラスターは、III, IV a, IV b と異なっていた。一方、クラスターIIに属する株は多様な切断パターンを示したが、ワクチン株と相同性99%の株は、ワクチン株と同じ RFLP パターンであった。ワクチンで PRRS をコントロールする場合、浸潤株とワクチン株との識別が必要であることから、RFLP パターンで農場を評価できるため、PRRS 清浄化に際しては有効な手段と考えられた。今回県内で検出されたクラスターIV b に属する株は、*Hinf* I で切断されず、九州地方で検出された株との識別が可能であった。RFLP は比較的簡便に行うことができるため、本 RFLP は有用であると考えられた。

今後もクラスター分類や RFLP を活用し、県内の PRRSV 浸潤状況を把握して、PRRS コントロール対策の一助にしたい。

稿を終えるにあたり、PRRSV の遺伝子解析の実施並びにご指導ご助言頂いた、動衛研 高木道浩先生に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) Wesley R, et al.(1998) Differentiation of a porcine reproductive and respiratory syndrome virus vaccine strain from North American field strains by restriction fragment length polymorphism analysis of ORF5. *J Vet Diagn Invest*, 10:140-144.



クラスタ III

クラスタ IVa

クラスタ IVb

クラスタ II

■2008 ~2010年検出株 ▲2011 ~2013年検出株 ●2014~2016年検出株

図 1 各農場の代表的な株の分子系統樹及びRFLPパターン

表 1 遺伝子解析を実施した農場

農場No	地域	検査材料	病性鑑定	検出年	クラスター(株数)
1	県北	肺	呼吸器症状	2013	Ⅲ(2)
2	県西	肺	呼吸器症状	2009, 11, 16	Ⅲ(3)
3	県北	血清		2010~13	Ⅲ(4)Ⅱ(1)
4	県南	血清		2010~12, 14	Ⅲ(5)
5	鹿行	血清		2008, 13	Ⅲ(4)
6	鹿行	血清		2010~12	Ⅲ(1)Ⅳa(3)
7	鹿行	血清		2008, 14	Ⅲ(1)Ⅳa(5)
8	県西	肺	育成豚の死亡	2014	Ⅲ(1)
9	県西	肺	育成豚の呼吸器症状	2012	Ⅲ(1)
10	県西	血清		2009~14	Ⅲ(6)未分類株(1)
11	県西	肺	育成豚の呼吸器症状	2014	Ⅲ(1)
12	県北	血清		2009, 15	Ⅲ(1)Ⅱ(1)
13	県西	肺	離乳豚の呼吸器症状	2016	Ⅲ(1)
14	鹿行	肺	育成豚の急死	2015	Ⅲ(1)
15	県西	肺	呼吸器症状	2014	Ⅲ(1)
16	県北	血清		2015	Ⅲ(1)
17	鹿行	肺	育成豚の発育不良	2009	Ⅲ(1)
18	県西	肺	肥育豚の死亡	2014	未分類株(1)
19	県西	肺	育成豚の急死	2012	未分類株(2)
20	鹿行	肺	離乳豚の削瘦	2012	Ⅳa(1)
21	県北	肺	離乳豚の死亡増加	2016	Ⅳa(1)
22	県西	胎仔の肺	母豚の食欲不振、流産	2016	Ⅳa(1)
23	鹿行	虚弱子豚の肺	死流産	2016	Ⅳa(7)
24	県北	胎盤	早産	2016	未分類株(1)
25	県北	肺・血清	死亡, 急死	2012~16	Ⅳb(13)
26	県北	肺	育成豚の死亡	2012~14	Ⅳb(4)
27	県北	血清		2015	Ⅱ(1)
28	県北	肺	発育不良	2014	Ⅱ(1)
29	県北	血清		2015	Ⅱ(1)
30	県北	血清		2014	Ⅱ(1)

表 2 検出年別戸数

検出年	クラスターⅡ	クラスターⅢ	クラスターⅣa	クラスターⅣb	未分類
1期 (2008~2010年)	1	7	1	0	0
2期 (2011~2013年)	1	8	2	2	2
3期 (2014~2016年)	4	10	4	2	2

(戸)

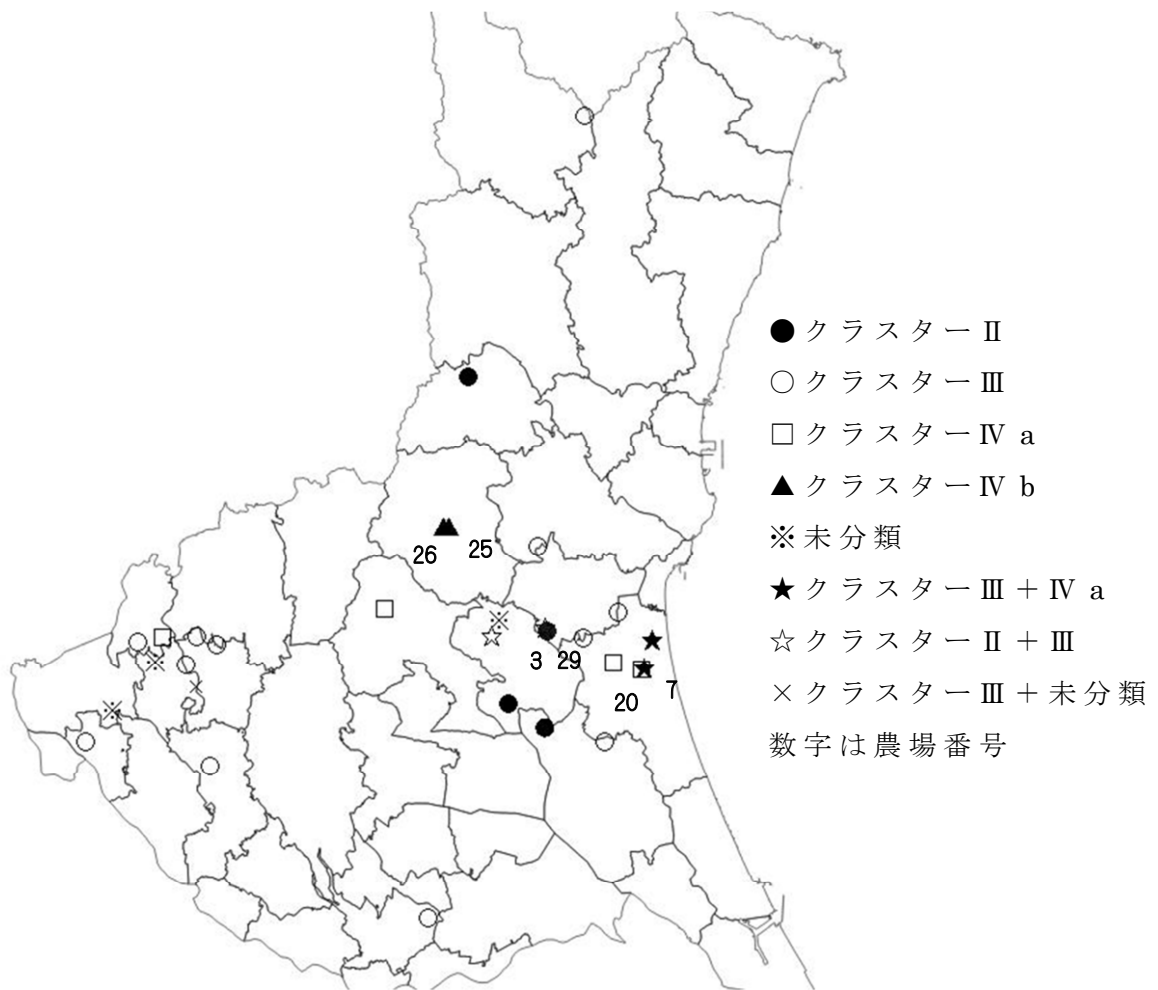


図2 各農場で検出された株のクラスター

表3 クラスタ II に属する株とワクチン株との相同性

検出農場 No.	制限酵素切断パターン	ワクチン株との相同性
27	1-1-2	91.5%
3	1-5-2	92.7%
30	2-5-2	99.0%
ワクチン株	2-5-2	

## 19. 飼育イルカにみられた皮膚病変の病理組織学的検索

県北家畜保健衛生所

○矢口 裕司 藤井 勇紀  
都筑 智子 前田 育子

水族館や動物園などの展示動物は多くが希少動物であり、種の保存の面から重要であると共に、動物とのふれあい等を通じて来場者への文化的及び教育的な役割も担っている。近年、高病原性鳥インフルエンザや口蹄疫など、重大な感染症が猛威を奮い、人々の関心が高まっているなか、展示動物の中にはそれらの感染症に感受性がある動物も含まれている。また、これらの動物が人獣共通感染症の原因となる病原体を保有している可能性も考えられ、展示動物についても、家畜保健衛生所が積極的にワンヘルスを意識した調査及び研究を実施していく必要がある。

今回、イルカの死因と皮膚病変の原因究明をきっかけに、複数個体の皮膚生検材料について病性鑑定を行った。イルカの皮膚疾患はパピローマウイルス感染症<sup>1)</sup>、非定型抗酸菌症<sup>2)</sup>、ラカジオーシス<sup>3)</sup>などの人獣共通感染症が知られており、併せてそれらの感染症の検索を行ったので、その概要を報告する。

### 発生状況

イルカを飼養する展示施設で、約3年前からほぼ全身に隆起した皮膚病変が多発したカマイルカ1頭が、平成28年6月下旬に発熱、白血球数の増加など、一般症状が悪化したため、治療するも7月上旬に死亡した。病性鑑定の結果、*Aspergillus fumigatus*による脳炎及び肺炎と診断した。

その後、同居イルカ4頭にも皮膚病変がみられたため、死亡イルカの皮膚及び皮膚病変を発症した同居イルカの皮膚生検材料の病性鑑定を実施した。

### 材料と方法

#### 1 供した材料

死体1頭の皮膚(No.1)、4頭の皮膚生検材料(No.2～5)について、病理学的検査、ウイルス検査、細菌検査を実施した(表1)。

##### (1) 病理学的検査

材料を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)染色を実施した。

イルカの皮膚疾患で報告されているパピローマウイルス感染症、非定型抗酸菌症、ラカジオーシスの関与を調べるため、No.1～5については、チールネルゼン

染色，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。また，No.1について，一次抗体に抗牛パピローマウイルス血清抗体を用いた免疫組織化学的検査（以下，免疫染色）を（国研）農研機構 動物衛生研究部門（以下，動衛研）に依頼した。

#### （2）ウイルス検査

No.1について，牛パピローマウイルスを検出するプライマー（Subgroup A,B<sup>4)</sup>，PV universal<sup>5)</sup>）及び既報<sup>1)</sup>のイルカパピローマウイルスの遺伝子配列を参照して作製した degenerated プライマーを用いたPCRを動衛研に依頼した。

#### （3）細菌検査

No.1～5を用いて，液体培地を用いた抗酸菌培養を約3週間実施し，培養液についてTelentiら<sup>6)</sup>の方法に従い *Mycobacterium* 属 hsp65 の PCR-RFLP により切断パターンを解析し，*M. marinum* の検出を試みた。

## 結果

### 1 皮膚病変の外貌

No.1は，背部，尾柄及び尾の広範囲で症状に隆起する皮膚病変が多発していた（図1）。No.2～5は，背部に限局して微小に隆起した皮膚病変が散発または孤発していた（図2）。

### 2 病理組織学的所見

病変は，No.1は表皮に，No.2～5は真皮に認められた。No.1は真皮乳頭が上方に隆起し，表皮との境界が不規則に配列し，有棘層や顆粒層の過形成が認められた（図3）。一部の顆粒層は核周囲の空隙形成や細胞質内における好酸性滴状物の出現が認められた。

No.2～5は，真皮浅層にリンパ球やマクロファージ浸潤及び線維芽細胞の増生が認められた（図4）。さらにNo.2，3，5は，真皮浅層に壊死巣，表皮に穿孔が認められた。No.2，4は，壊死巣内にチールネルゼン染色で陽性を示す抗酸菌が少数認められた（図5）。

PAS反応及びグロコット染色では，いずれの検体も陰性であった。No.1における免疫染色では，抗牛パピローマウイルス抗体に対する陽性反応は認められなかった（表2）。

### 3 ウイルス検査

No.1の皮膚で実施したパピローマウイルスのPCRで，特異遺伝子は増幅されなかった（表2）。

### 4 細菌検査

抗酸菌培養を実施したNo.1～5の液体培地の培養液のPCR-RFLPで，*M. marinum* の切断パターンは確認されなかった（表2）。

## 診断

検査結果から、No.1は乳頭腫症、No.2, 4は非定型抗酸菌症と診断した。No.3, 5は肉芽腫性真皮炎を疑う所見も認められたが、病原体を見出すことができなかったことから、創傷の治癒過程の可能性も考えられた（表2）。

## 考察

イルカ5頭の皮膚病変は多様であった。死亡個体であるNo.1は、肺と脳で真菌による病変が確認されたことから、加齢もしくは免疫低下などの要因で、真菌が感染し死亡したと示唆された。No.1の皮膚病変は、他の4頭と異なり、表皮の過形成が特徴であり、真菌は皮膚病変には関与していなかった。皮膚病変は、組織所見から乳頭腫症と診断したが、原因として強く疑われるパピローマウイルスの関与<sup>7)</sup>は証明できなかった。この個体の皮膚病変が広範囲だったことから生前から感染症が疑われたが、病歴及び治療歴が長期間であったこと、死亡直近での皮膚病変の拡がりがなかったことから、解剖時に病原体が消失していた可能性があると考えられた。

No.2, 4は、*M. marinum*と類似した抗酸菌が病理検査で認められたことから非定型抗酸菌症と診断した。*M. marinum*は環境中に多く分布しており、魚類や水槽のフィルターなどからも検出されている<sup>8)</sup>。そのため、*M. marinum*は飼育水にも存在していると考えられたが、皮膚と同時に実施した飼育水の濾過水を用いた細菌検査では、検出されなかった。したがって、飼育水の*M. marinum*の菌量は検出限界以下と考えられたが、餌の魚類（青魚）などから高率に分離されるため、それらを摂取した直後のイルカによる咬傷で、感染した可能性も考えられた。また、ヒトの*M. marinum*感染症も時折発生が報告されている。皮膚の創傷部位からの感染が最も一般的で、皮膚に結節、腫脹、潰瘍などの症状を示し、人獣共通感染症として注意が必要である。ヒトでの発症例は、魚類に接触する機会が多い水族館や魚市場関係者に限られ、古くから「水族館病」として知られている。この様なヒトの発病疫学を踏まえると、イルカの非定型抗酸菌症の初期病変は、創傷（咬傷）によって起こることが容易に想像できる。一方、免疫が低下したイルカでは、播種性病変を形成するとの報告<sup>2)</sup>もあるため、非定型抗酸菌症のイルカは、注意深く経過を観察することが重要と考える。

No.3,5の皮膚病変は、肉芽腫性真皮炎と考えられる所見もみられ、非定型抗酸菌の関与が否定できないが、病原体が検出されなかったことに加え病変が局限していること、イルカ同士の咬傷などにより体表に傷が出来やすいことを考えると、創傷による治癒過程の可能性が高いと考えられた。

これらのことから、イルカの皮膚病変が、感染症なのか創傷なのかを見極める



には、体調や皮膚病変分布の拡がりなどの観察に加えて、病性鑑定による早期診断が重要である。病変が限局している場合は、創傷部位からの病原体の感染を防ぐため、傷口の保護やストレス要因の排除、体調管理に注意し、皮膚病変の拡がりを注意深く観察する必要がある。万一、免疫低下やストレスなどによって、全身症状を伴った場合は、免疫が正常に機能しないために皮膚病変が全身に広がる恐れがある。よって体調の改善に努め、感染症を疑う場合は抗菌性物質による治療を行う必要がある（図6）。

また、非定型抗酸菌症などは、ヒトにも感染しうる人獣共通感染症である。そのため、ワンヘルスの観点から展示動物はもとより作業従事者への感染対策も併せて、講じていく必要がある。

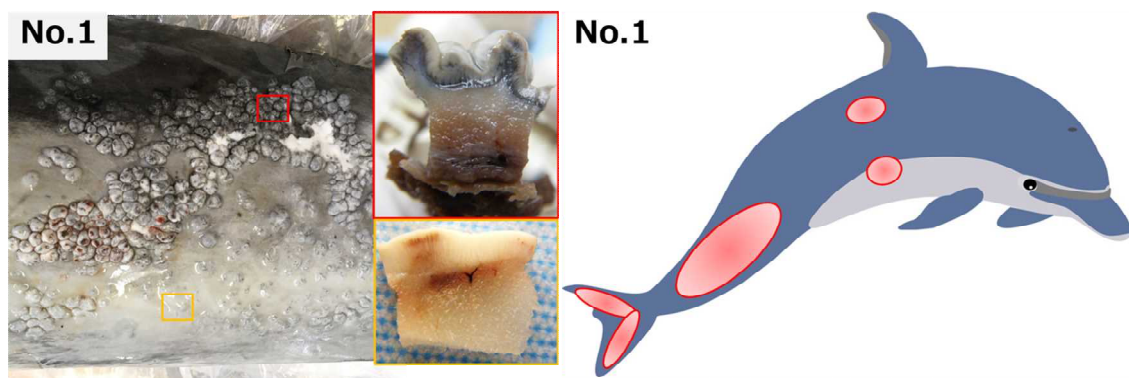
稿を終えるにあたり、検査にご尽力及びご助言いただいた（国研）農研機構動物衛生研究門 芝原友幸先生，花房泰子先生，渡邊聡子先生，谷村信彦先生に深謝致します。

## 参考文献

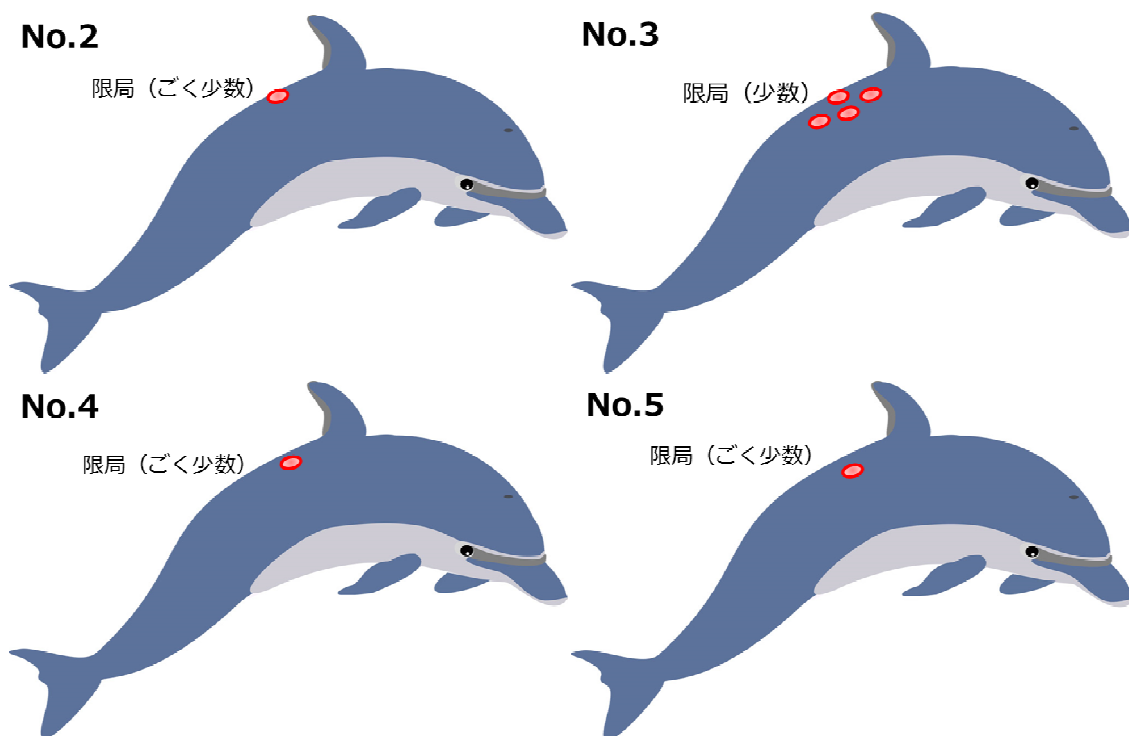
- 1) Gottschling M et al., Mol Phylogenet Evol, 59, 34-42, 2011
- 2) 水島 亮，東北病理標本検討会（2014）における事例，動衛研研究報告，122，11-17，2016
- 3) 田中ら，イルカの背部皮膚腫瘍，日生研たより，61（3），4，2015
- 4) Maeda Y et al., Vet Microbiol, 121, 242-248, 2007
- 5) Forslund O et al., J Gen Virol, 80, 2437-2443, 1999
- 6) Telenti A et al., J Clin Microbiol, 31, 175-178, 1993
- 7) 板倉ら，動物病理学総論，第1版（第6刷），文永堂，220-222，2000
- 8) 飯田ら，水族館職員に生じた *Mycobacterium marinum* 感染症，皮膚，40，76-79，1998

**表 1** 検体の詳細と病変分布

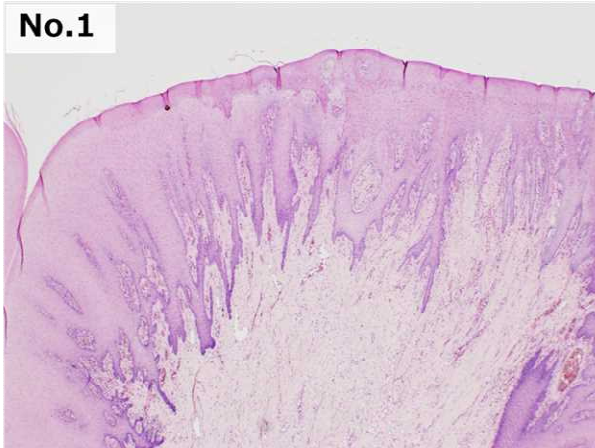
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
種類	カマイルカ	オキゴンドウ	オキゴンドウ	カマイルカ	バンドウイルカ
性別	♀	♀	♂	♀	♀
飼育年数	15年	8年	14年	15年	9年
材料	死体（皮膚）	皮膚生検	皮膚生検	皮膚生検	皮膚生検
皮膚病変分布	広範囲	限局 (ごく少数)	限局 (少数)	限局 (ごく少数)	限局 (ごく少数)



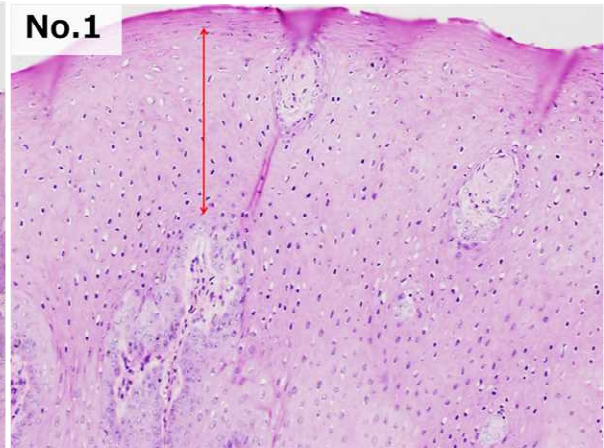
**図 1** No. 1の皮膚病変の肉眼写真及び病変分布



**図 2** No. 2～5の皮膚病変の分布

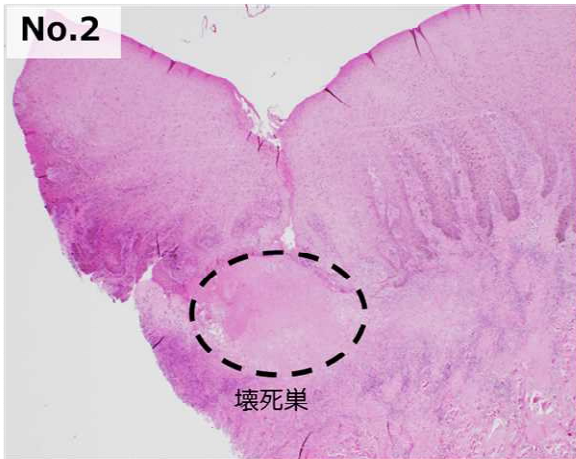


No.1  
真皮乳頭が上方に隆起し，表皮は過形成を呈す

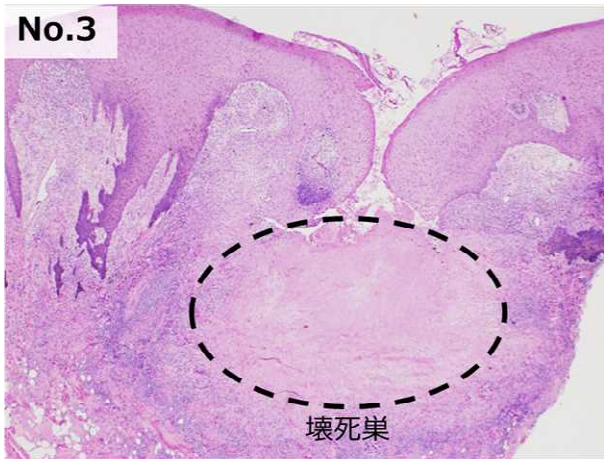


No.1  
顆粒層は肥厚し（矢印），核が濃縮している

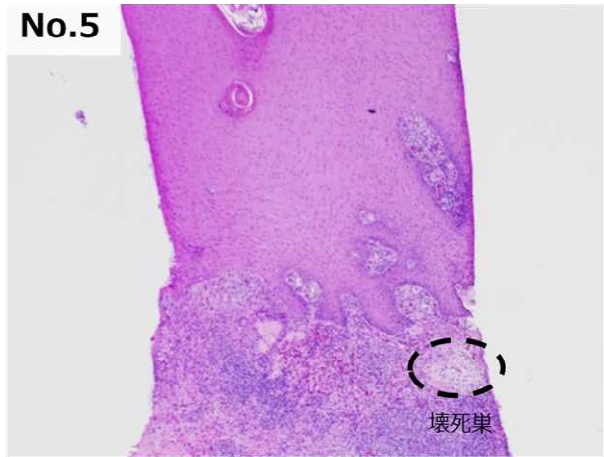
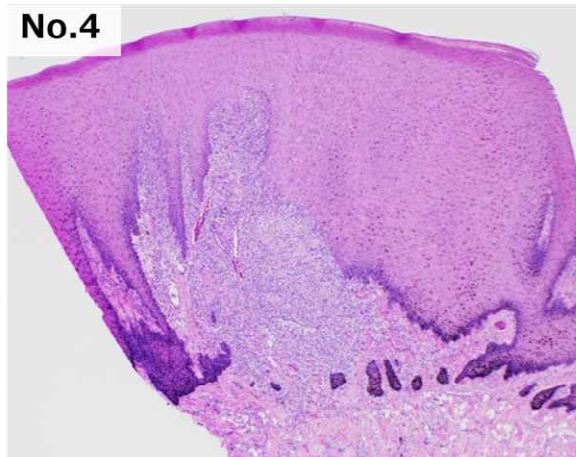
図3 No. 1の組織写真（HE染色）



壊死巣



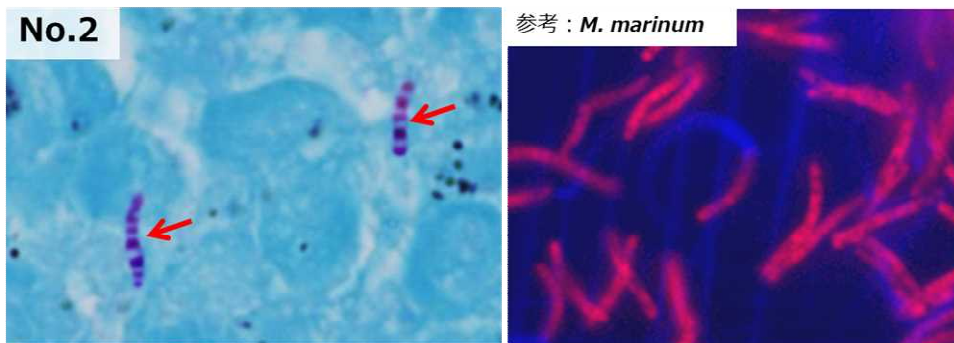
壊死巣



壊死巣

真皮に壊死巣（No.2,3,5），周囲にリンパ球及びマクロファージ浸潤，線維芽細胞の増生を認めた

図4 No. 2～5の組織写真（HE染色）



壊死巣内には少数の抗酸菌が認められる

参考： *M. marinum*

引用： Photo Gallery of Bacterial Pathogens  
<https://www.atsu.edu/faculty/chamberlain/website/gallery.htm>

図5 No. 2の皮膚病変部にみられた抗酸菌（チールネルゼン染色）

表2 検査結果及び診断

	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5
組織所見					
A. 表皮	過形成	病変なし (穿孔)	病変なし (穿孔)	病変なし	病変なし (穿孔)
B. 真皮					
1) 壊死巣	-	++	++	-	+
2) 肉芽腫	-	+	±	++	±
3) 線維化	-	±	+	-	-
4) その他	真皮乳頭の隆起				出血伴う
抗酸菌染色 (チールネルゼン)	-	+ (少数)	-	+ (少数)	-
真菌染色 (PAS, グロコット)	-	-	-	-	-
病原検索					
1) パピローマウイルス -PCR及び免疫染色	-	NT	NT	NT	NT
2) <i>M. marinum</i> -PCR	-	-	-	-	-
診断	乳頭腫症	非定型抗酸菌症	不明 (創傷)	非定型抗酸菌症	不明 (創傷)

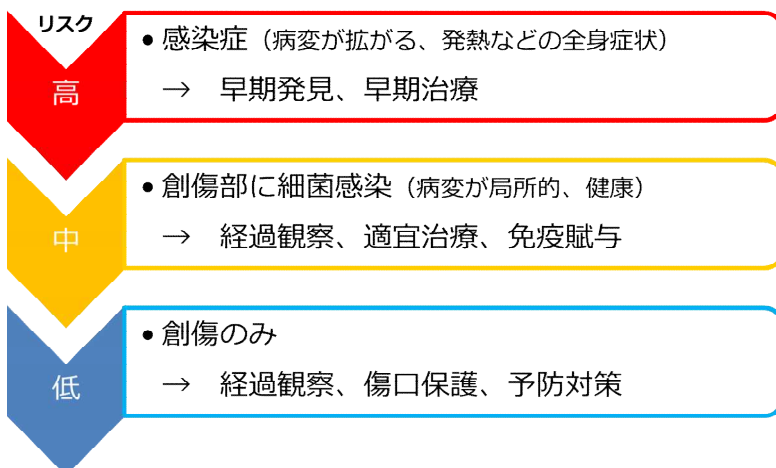


図6 イルカの皮膚病変に合わせた対策