

【短 報】 産業動物

接合菌が肝臓に壊死桿菌症様病巣を形成した黒毛和種子牛の1例

田中 佑典¹⁾ 豊留 孝仁¹⁾ 猪熊 壽¹⁾ 片山 享輔²⁾ 渡邊 謙一¹⁾
堀内 雅之¹⁾ 古林 与志安¹⁾

1) 帯広畜産大学獣医学研究部門 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11)

2) 十勝NOSAI (〒089-1182 帯広市川西町基線59番地28)

要 約

黒毛和種22日齢の雌子牛の剖検時に、肝臓実質に多発する直径約1 cm大の黄白色菊花状壊死巣を認め、その特徴的な肉眼病変から、*Fusobacterium necrophorum* 感染による肝臓多発性巣状壊死を疑った。しかし、その後の病理組織学的検査および分子生物学的検査の結果から、肝臓病変は接合菌の一種である *Mortierella wolfii* の感染によって生じたものであることが確認された。肝臓多発性巣状壊死は、壊死桿菌症をはじめ細菌感染性のものが多く報告されているが、鑑別診断に真菌感染症も加える必要があると考えられた。

キーワード：黒毛和種牛、肝臓多発性巣状壊死、壊死桿菌症、*Mortierella wolfii*

-----北獣会誌 62, 526~529 (2018)

牛の肝臓における巣状壊死はと畜検査や剖検時に偶発的に観察されることが多い病変である。特に、肝臓の直径数cm程度の円形～菊花状の多発性の巣状壊死は、壊死桿菌 (*Fusobacterium necrophorum*) 感染によって形成される特徴的な病変の一つと考えられており、診断的価値は高いとされている^[1,2]。著者らは、肝臓全葉に多発性巣状壊死を認めた黒毛和種子牛の1症例を経験し、その特徴的な肉眼病変から壊死桿菌症を疑った。しかし、そのあとの病理学的検査結果から、接合菌の一種である *Mortierella wolfii* の感染による肝臓多発性巣状壊死と診断した。接合菌が壊死桿菌症様の肉眼病変を形成することは、診断上有用な知見と考えられたのでここに報告する。

症 例

症例は黒毛和種の雌子牛で、7日齢より後躯のふらつきを認め、8日齢で起立不能となった。以降、症状に改善が認められず、22日齢で帯広畜産大学に搬入され、剖検に供された。

病理学的検査結果

1) 病理解剖検査

肝臓の全葉において、直径0.5~1.5 cm大の菊花状～円形の黄白色巣状病変が、表面および断面に多発していた (図1)。同病巣の断面は黄白色を呈していた。また、



図1. 肝臓実質で認められた多発性巣状壊死 (スケール=5 cm)

全葉にわたって直径0.5~1.5 cm大の菊花状、円形の黄白色巣状壊死病変が多発している。

連絡責任者：堀内 雅之 帯広畜産大学獣医学研究部門

〒080-8555 帯広市稲田町西2線11

TEL : 0155-49-5361 FAX : 0155-49-5364 E-mail : horiuchi@obihiro.ac.jp

第一胃と第四胃の粘膜面には直径0.2~1 cm大の糜爛と潰瘍が多発していた。後躯のふらつきの原因となりうる所見として、腹大動脈の分岐部から外腸骨動脈の大腿部にかけての6~7 cmの器質化した血栓、両後肢の筋肉の壊死が観察された。本症例のふらつきや起立不能の臨床症状は塞栓症によるものと考えられたが、その詳細はAnrakuらが報告した^[3]。剖検時、胸腺の発達は正常であり、その他主要臓器で著変は観察されなかった。

2) 病理組織検査

定法によるHE染色による検索では、肝臓では肉眼変化と一致して、壊死巣が多発性に観察された(図2)。壊死巣では、好中球とリンパ球を主体とする炎症細胞がびまん性に浸潤していた(図3)。肝内静脈には微小血

栓が散発していた(図4)。また、壊死巣のごく一部の領域で、中空状を呈する真菌が観察された(図5)。第一胃および第四胃の潰瘍病変部では、好中球主体の炎症細胞が筋層に至るまで多量に浸潤し、同部では中空状を呈する真菌も認められた。その他、主要臓器に著変は認められなかった。

肝臓、および第一胃と第四胃における病原体を確認するためにグラム染色、ワルチン・スターリー染色、PAS染色、グロコット染色を実施した。その結果、肝臓の壊死巣内においてPAS染色陽性、グロコット染色で強染される真菌が、HE染色で観察されたものよりも多数観察された。これら真菌は薄い壁に囲まれ中空状を呈しており、菌幅は2~15 μmと不均一であった。また、菌糸は直角~鋭角に不規則に分岐していた(図6)。真菌は、主に壊死巣内に分布していたが、血管壁への浸潤も散見された。また、第一胃および第四胃では、潰瘍部においてPAS染色で陽性を示し、グロコット染色で強染され

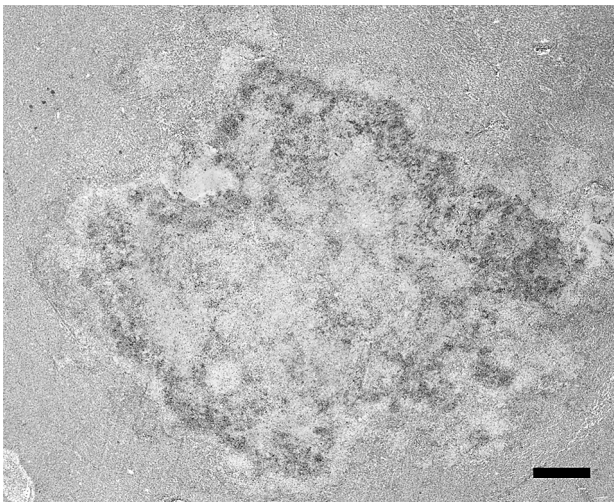


図2. 肝実質における壊死巣 (HE染色、スケール=1000 μm)

壊死巣内には豊富な細胞成分の浸潤が認められ、壊死巣内は一様ではない。

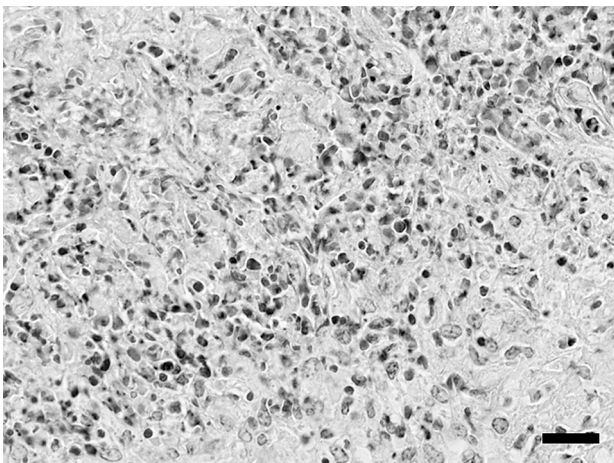


図3. 肝実質における壊死巣の拡大像 (HE染色、スケール=20 μm)

壊死巣内には、壊死細胞、核崩壊産物が観察された他、好中球とリンパ球をはじめとする炎症細胞がびまん性に浸潤していた。

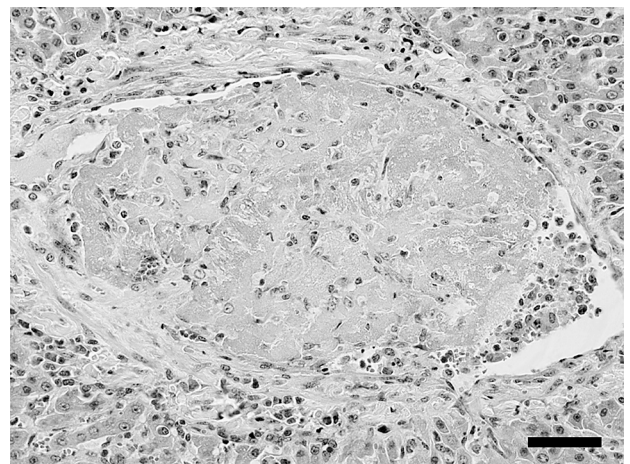


図4. 肝内静脈で観察された血栓 (HE染色、スケール=50 μm)

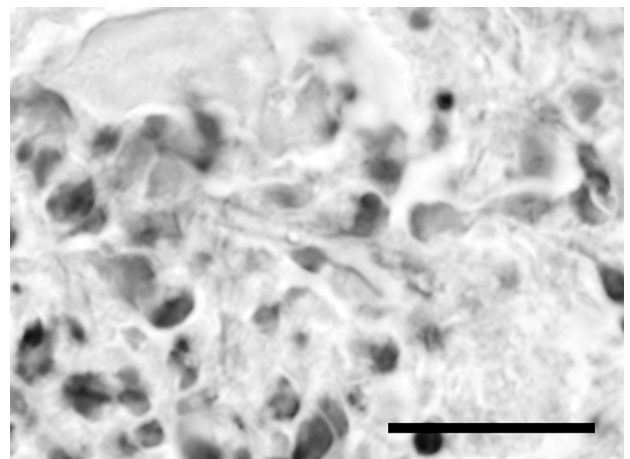


図5. 肝臓壊死巣に認められた真菌 (HE染色、スケール=20 μm)

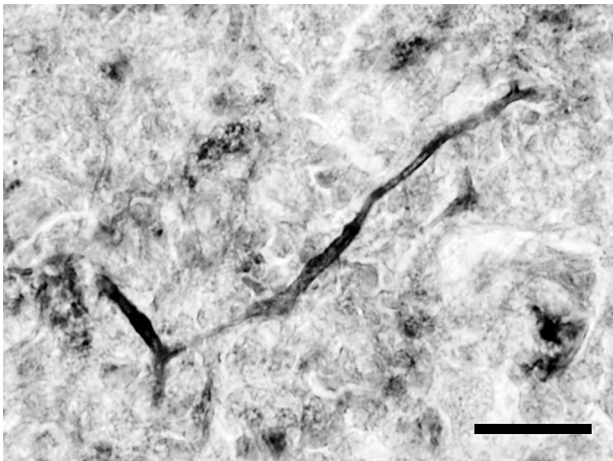


図6. 肝臓壊死巣内に認められた真菌
(グロコット染色、スケール=20 μm)

真菌は不整な角度に分岐しており、不整な菌幅に囲まれ中腔状を呈していた。

る真菌が観察された。それら真菌は、肝臓で認められたものと形態学的特徴が一致した。グラム染色およびワルチン・スターリー染色を行ったが、肝臓の壊死巣では明確な細菌は観察されなかった。

3) 分子生物学的検査

病理組織検査で確認された真菌を同定するために分子生物学的検査を行った。パラフィン包埋された壊死巣を含む肝臓の組織から、NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel, Germany) を用いてDNAを抽出し、ITS5 & ITS4プライマーセットを用いて、ITS領域をEmeraldAmp PCR Master Mix (タカラバイオ、滋賀) を用いたPCRによって増幅した^[4,5]。得られた685 bpの増幅産物をダイレクトシーケンス法によって塩基配列を解析し、BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) により相同性を解析した。今回得られた塩基配列は、*Mortierella wolfii* として登録されている複数の遺伝子配列と98-100%の相同性があった。

考 察

BLAST解析での高い相同性により、今回確認された真菌は接合菌の一種である*M. wolfii*と判断した。*M. wolfii*は、特にオセアニア地域における成牛の流産や子牛の肺炎の原因として獣医学上の問題となっている^[6]。また、まれにはあるが、肝臓で直径0.4~5.0 cmのさまざまな大きさの壊死が肝実質に多発することが報告されている^[6-11]。わが国では牛における本菌の感染例は肝臓に病巣を形成した1例が報告されており^[7]、北海道でも新生子牛の小脳、肝臓、腎臓などへの感染例の報告がある^[8]。*M. wolfii*による肝臓の肉眼病変は、壊死

桿菌症の肉眼病変と類似しているとUzalらによって指摘されており、肉眼的な鑑別は困難とも報告されている^[6]。肝臓に発生する壊死の多くは*F. necrophorum* (81-100%) および *Trueperella pyogenes* (0-50%) といった細菌感染に由来するものであり^[2]、本症例も肝臓の多発性巣状壊死という肉眼所見からは*F. necrophorum*感染による壊死桿菌症が強く疑われた。しかし、その後の検査から*M. wolfii*感染による病変であることが明らかとなり、組織学的検査の重要性が再確認された。

*M. wolfii*感染と壊死桿菌症の鑑別には組織学的検査が必須であると考えられるが、今回、当初の組織学的検査では真菌の観察は困難であった。そこで、本症例と壊死桿菌症の組織病変の相違を検討した。壊死桿菌症の肝臓の巣状病変部は、組織学的には好酸性均質無構造領域の壊死巣として観察され、白血球などの細胞成分はその壊死巣周囲を取り囲み、周囲の肝組織から明瞭に区画する^[1]。それに対して本症例では、壊死巣の内部への炎症細胞のびまん性浸潤が観察された。この壊死巣の組織病変の違いは、壊死桿菌症との鑑別に有用であると考えられた。また、Uzalらは、*M. wolfii*感染と壊死桿菌症の鑑別には、*M. wolfii*感染時に形成される血栓および血管炎の所見の有無が有用であるとしている^[6]。本症例においても多発性の微小血栓が確認されており、Uzalらの報告と矛盾しないものであった。本症例のように、HE染色のみの組織検査では真菌が明瞭に認められないような症例であっても、壊死巣内への炎症細胞の浸潤が認められた場合や、血栓、血管炎が認められた症例では、PAS染色とグロコット染色を実施することが組織診断を行ううえで必要と考えられた。

本症例では、第一胃および第四胃で観察された真菌は、肝臓で観察された真菌と形態学的に一致していた。また、*M. wolfii*は土壤中に生息する真菌であることから^[4]、経口的に摂取された真菌が、第一胃および第四胃の糜爛・潰瘍部から侵入し、門脈経由で肝臓に達したと推察された。

*M. wolfii*をはじめとする接合菌症の発症には、宿主の免疫機構が密接に関係しており、医学領域では悪性腫瘍の存在、骨髄移植、薬剤の静脈内投与など、免疫を低下させる背景がある場合に重篤化しやすいと報告されている^[12]。本症例では、胸腺の発達は正常であり、個体の免疫低下を示唆する所見は得られず、免疫機能の状態と発病との因果関係は不明であった。

以上のように、本症例で肝臓に認められた壊死桿菌症様の多発性巣状壊死は、真菌感染症と診断された。肉眼

検査は、病理学的検査のうち重要な行程の一つである。しかし、本症例のように特徴的な肉眼病変を呈した症例であっても、確定診断には組織学的検査を実施することが重要であると再確認された。

引用文献

- [1] Cullen JM, Stalker MJ: Chapter 2-Liver and Biliary System, Jubb, Kennedy & Palmer's Pathology of Domestic Animals, Maxie MG ed, 6th ed, Vol 2, 258-352. e251, W. B. Saunders, US-MO (2016)
- [2] Nagaraja TG, Chengappa MM: Liver abscesses in feedlot cattle: a review, J Anim Sci, 76, 287-298 (1998)
- [3] Anraku M, Tanaka Y, Koyama K, Watanabe K-i, Horiuchi N, Kobayashi Y, Inokuma H: Aortic thromboembolism with hind limb paralysis in a Japanese Black calf, Comp Clin Path, 27, 1093-1095 (2018)
- [4] Wagner L, Stielow B, Hoffmann K, Petkovits T, Papp T, Vagvolgyi C, de Hoog GS, Verkley G, Voigt K: A comprehensive molecular phylogeny of the Mortierellales (Mortierellomycotina) based on nuclear ribosomal DNA, Persoonia, 30, 77-93 (2013)
- [5] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, PCR protocols; a guide to methods and applications, Innis MA, et al eds, 315-332, Academic, San Diego US (1990)
- [6] Uzal FA, Connole MD, O'Boyle D, Dobrenov B, Kelly WR: Mortierella wolfii isolated from the liver of a cow in Australia, Vet Rec, 145, 260-261 (1999)
- [7] Komoda M, Itoi Y, Ozai Y, Kimura Y, Koizumi S, Takatori K: An infection of cow with Mortierella wolfii, Mycopathologia, 101, 89-93 (1988)
- [8] 山本敦子、信本聖子、小林亜由美、和田好洋、稲垣華絵、花房泰子、芝原友幸: Mortierella wolfii感染による新生子牛の壊死性小脳炎、日獣会誌、68、112-116 (2015)
- [9] MacDonald SM, Corbel MJ: Mortierella wolfii infection in cattle in Britain, Vet Rec, 109, 419-421 (1981)
- [10] Munday JS, Wolfe AG, Lawrence KE, Pandey SK: Disseminated Mortierella wolfii infection in a neonatal calf, N Z Vet J, 58, 62-63 (2010)
- [11] Davies JL, Ngeleka M, Wobeser GA: Systemic infection with Mortierella wolfii following abortion in a cow, Can Vet J, 51, 1391-1393 (2010)
- [12] Roden MM, Zaoutis TE, Buchanan WL, Knudsen TA, Sarkisova TA, Schaufele RL, Sein M, Sein T, Chiou CC, Chu JH, Kontoyiannis DP, Walsh TJ: Epidemiology and outcome of zygomycosis: a review of 929 reported cases, Clin Infect Dis, 41, 634-653 (2005)