

牛 RS ウイルス及び牛コロナウイルスによる呼吸器病一症例の病理学的特徴

中央家畜保健衛生所

○綿村 崇宏 大矢 美帆 三浦 良彰

要 約

令和3年12月、約100頭の牛を飼養する乳肉複合農場で、同一牛舎内の2か月齢未満の子牛群に発熱と呼吸器症状が急速に伝播し、46日齢の交雑種1頭が死亡したため、病性鑑定を実施した。剖検では肺全域の所見は概ね均一で、色調退色、軽度に硬化し、含気感が消失していた。組織学的検査で、び慢性肺胞障害(DAD)と気管支上皮の剥離が認められた。免疫染色により、肺胞マクロファージに牛RSウイルス(BRSV)の、気管支上皮に牛コロナウイルス(BCoV)の陽性反応が認められた。ウイルス学的検査で肺から両ウイルスの特異遺伝子が検出された。病理学的に、BRSVの病変は感染後1週間以上経過した亜急性期である一方、BCoVの病変は感染後1~2日程度の急性期のものであることが示唆された。本症例は、肺にBRSVが侵入し、病変がDADに発展したことで病態が重篤化したことに加え、さらにBCoVによる呼吸器障害が生じたため、死亡したと考察された。免疫染色を活用し、2種の異なるウイルスが一症例の呼吸器に独立した特徴のある病変を形成したことを証明した、複雑で興味深い症例であると共に、牛の呼吸器病における、BCoVの重要性を示唆する症例である。

はじめに

牛の感染性呼吸器病に関連した経済的な被害は大きいと考えられており^{1),2)}、長きに渡り、牛における最も重要な疾患の一つに位置づけられている³⁾。しかし、牛の呼吸器病では、複数の要因が複合的に作用することが頻繁に生じるがゆえに、現場での疾病診断はより困難なものになっている⁴⁾。そのため、病理学的には、各種病原体により引き起こされる解剖所見と組織学的所見を併せて理解することが、疾病診断にとっては重要であると筆者は考えている。

牛に呼吸器病を引き起こすウイルスのうち、特に重要と考えられているのは、牛RSウイルス(BRSV)、牛パラインフルエンザウイルス3型(BPIV3)、牛ヘルペスウイルス1型(牛伝染性鼻気管炎ウイルス:IBRV)である⁵⁾。このうちBRSVは、世界中に分布し⁶⁾、子牛に致死的な呼吸器病を起こす主要なウイルスであると考えられている^{2),7)}。BRSVによる肺炎の典型例では、肉眼的に肺の頭腹側は無気肺状で、対照的に背尾側は膨化し、組織学的には合胞体形成を伴う気管支間質性肺炎とされている^{2),7)}。しかし、個体の免疫状態や病期の進行により、その病変は多様であり、重篤化する例や、び慢性肺胞障害(Diffuse Alveolar Damage:DAD)に発展する例もある⁷⁾。

牛コロナウイルス(BCoV)もBRSVと同様、世界中に分布しているとされ⁸⁾、牛の下痢症の原因の一つとして広く認知されている^{9),10)}。1982年

に世界で初めて牛の呼吸器病に関与する可能性が報告された¹¹⁾ものの、現在でもその役割については議論されており、未だ確定に至っていない^{10),12)}。しかし、近年は呼吸器病の原因として重要視される傾向にあり、いくつかの感染実験が試みられている^{9),10),13)}。成書でもBCoVによる呼吸器病の記述は少なく、子牛でまれに呼吸器病を引き起こし、ウイルスは鼻又は気管の粘膜上皮などの、比較的上部の気道で複製すると考えられている⁷⁾。

発 生 状 況

当該農場は、総飼養頭数が約100頭の乳肉複合一貫農場である。発生群は4日~53日齢の子牛10頭で、全頭が自家産であり、同一牛舎内の通路に繋ぎ又はペンで飼育されていた。また、いかなるワクチンも接種されていなかった。

令和3年12月7日に、本牛群内の1頭に咳嗽等の呼吸器症状が確認されたのを皮切りに、その後約1週間で8頭に発熱と呼吸器症状が伝播した。牛群の発症経過等を表1に示す。

本症例は12月8日に発症し、抗生物質・抗炎症剤・気管支拡張剤・抗アレルギー剤といった多種の薬剤による治療を受けたものの、12月15日に死亡した。呼吸器症状は、死亡しなかった7頭と比較し、進行性で重度であった。

なお、当該農場では、令和3年2月に近隣農家から牛の導入歴があるものの、その後の導入はない。また、令和3年10月には、一旦市場出荷し

た牛を農場に戻していた。

表 1 発症牛と呼吸器症状

個体	日齢	発症日	呼吸器症状
A	53	12/7	咳嗽 気管・肺の軽度雑音
本症例	46	12/8	開口呼吸 流涎 咳嗽 重度肺雑音 起立不能
B	7	12/12	肺の軽度雑音
C	24	12/12	咳嗽 肺の軽度雑音
D	5	12/12	不明
E	4	12/13	咳嗽 気管・肺の雑音
F	4	12/13	咳嗽
G	35	12/15	気管・肺の軽度雑音

材料及び方法

1 材料

交雑種、46日齢、雌、67.5kgの斃死個体。

2 方法

(1) 病理学的検査

ア 病理組織学的検査

剖検後、10%中性緩衝ホルマリンで固定、常法に従いパラフィン包埋し薄切後、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を実施し、光学顕微鏡下で観察した。

イ 免疫組織化学的検査

肺、気管及び気管支を材料として、抗 BRSV ポリクローナル抗体 (DAKO) 並びに抗 BCov ポリクローナル抗体 (動衛研) を用い、ポリマー法による検査を実施した。

(2) ウイルス学的検査

肺を材料として、10%PBS 乳剤を作製し、核酸を抽出したものを検体とし、RT-PCR 法により BRSV、BCov、BPIV3 の、PCR 法により IBRV の特異遺伝子の検出を行った。

(3) 細菌学的検査

主要臓器を材料とし、5%馬血液加トリプトソ

イ寒天培地及び DHL 寒天培地に直接塗抹し、37°Cで一晩又は 48 時間好気培養した。

(4) マイコプラズマ検査

肺を材料として、10%PBS 乳剤を作製し、核酸を抽出したものを検体とし、PCR 法により *Mycoplasma bovis*、*M. alkalescens*、*M. bovirhinis* 及び *M. dispar* の特異遺伝子の検出を行った。また、同乳剤を NK 液体培地に接種し、37°Cで 1 週間培養した。各培養液は NK 寒天培地に画線塗抹し、37°C、5%CO₂ 下で培養した。

成績

1 病理学的検査

(1) 病理解剖検査

主要な病変は肺に認められた。肺の全葉が高度に退色し、触診では弾力が増加し、含気感が消失していた (図 1)。断面では、気管支の走行に沿い実質が赤色化し、左右中葉の一部に暗赤色斑状病変が認められた。また、右中葉先端部が胸壁と癒着していた。肺の付属リンパ節には、一様に高度の腫大がみられた。



図 1 肺の外貌

(2) 病理組織学的検査及び免疫組織化学的検査

概要を表 2 に示す。肺は右前葉前部、右後葉、左前葉後部、左後葉を観察し、軽度の差異はみられるものの、全ての部位で高度の肺胞障害を伴う間質性肺炎が認められた。間質は漿液の滲出、線維芽細胞の浸潤により高度に肥厚していた。I 型肺胞上皮は多くが変性・剥離し、硝子膜がび慢性高度に認められると共に、II 型肺胞上皮が高度に増生していた (図 2)。肺胞腔には剥離上皮と共に好中球・腫大した肺胞マクロファージが軽度～中等度に浸潤していた。また、腔内には出血を伴

う線維素の析出も散見された。これらの組織所見から、本症例は DAD であったと考えられた。気管支～細気管支では、軽度の好中球・マクロファージの浸潤を伴い粘膜上皮が剥離していた。免疫組織化学的検査では、肺胞マクロファージに BRSV の陽性反応がわずかに認められ、気管支・細気管支上皮に BCoV の陽性反応が多量に認められた。

気管では、粘膜上皮に軽度の剥離・重層化・変性がみられ、線毛は高度に消失していた (図 3)。粘膜固有層に中等度の出血、リンパ球・マクロファージの浸潤がみられた。免疫組織化学的検査では、粘膜上皮に BCoV の陽性反応が中等量認められた。

胸腺・回腸パイエル板・各リンパ節では、リンパ球が中等度～高度に減数していた。

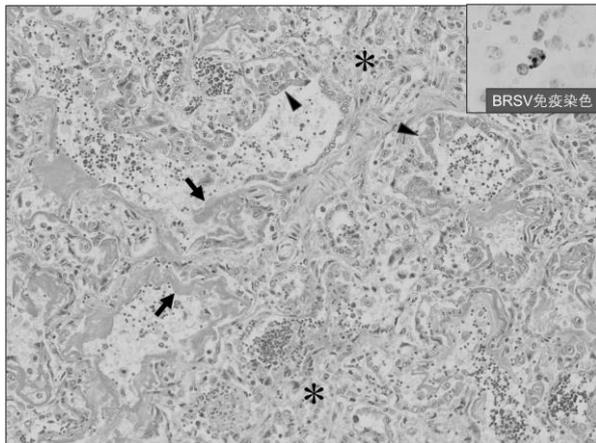


図 2 肺 肺胞障害を伴う間質性肺炎 HE 染色
硝子膜形成 (矢印)
II 型肺胞上皮の増生 (矢頭)
間質の肥厚 (*)
挿入図 BRSV 免疫染色

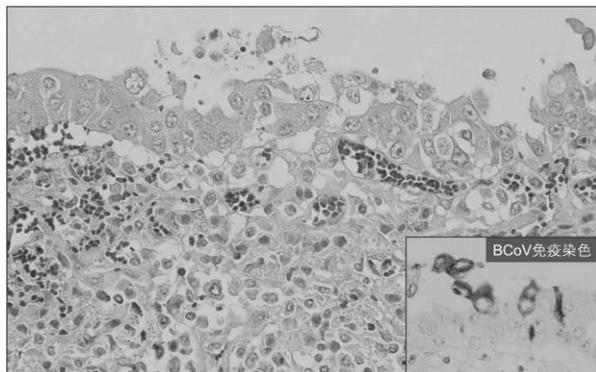


図 3 気管 粘膜上皮の剥離 HE 染色
挿入図 BCoV 免疫染色

表 2 病理学的検査成績

	肺	気管支	気管
病変	び慢性肺胞障害 (DAD)	上皮の剥離	上皮の剥離
免疫染色 BRSV*	+	-	-
免疫染色 BCoV*	-	+++	++

*+: 少量、++: 中等量、+++ : 多量

2 ウイルス学的検査

肺の一部分から、BRSV 及び BCoV の特異遺伝子が検出された (表 3)。

表 3 ウイルス遺伝子検査

	BRSV	BCoV	BPIV3	IBRV
右前葉 前部	-	+	-	-
右後葉	-	-	-	-
左前葉 後部	+	-	-	-
左後葉	-	-	-	-

3 細菌学的検査

主要臓器から有意菌は分離されなかった。

4 マイコプラズマ検査

肺の広範囲から *M. dispar* の特異遺伝子が検出された (表 4)。人工培地でマイコプラズマは分離されなかった。

表 4 マイコプラズマ遺伝子検査

	Mdis*	Malk†	Mbor‡	Mbov§
右前葉 前部	+	—	—	—
右後葉	+	—	—	—
肺 左前葉 後部	+	—	—	—
左後葉	+	—	—	—

* Mdis : *M. dispar*

† Malk : *M. alkalescens*

‡ Mbor : *M. bovirhinis*

§ Mbov : *M. bovis*

考 察

本症例は、「牛 RS ウイルス感染症」及び「牛コロナウイルス感染症」と診断された。

M. dispar は肺の広範囲に分布していたと考えられるが、組織学的な病変が認められなかったことから、肺への感染後日数は短期であり、単独での呼吸器症状への関与は証明されないものの、他の病原体に対する易感染要因になっていたと推察された。

病理学的検査で、肺には DAD が極めて広範囲に認められたことから、これが呼吸器病の主因であると考えられた。DAD は、RS ウイルス、ヘルペスウイルス、パラインフルエンザウイルス等の感染によるものの他、熱損傷、毒物、敗血症の一分症、高度の外傷、虚血性肺損傷、慢性左心疾患、肺炎、薬物の副作用等、その原因はきわめて多岐に渡るとされている⁷⁾。本症例では、免疫組織化学的検査で DAD 病変部の肺胞マクロファージに BRSV 陽性反応が認められたこと、疫学的・病理学的にその他の原因の関与が認められなかったことから、同ウイルスの感染により DAD が形成されたと考えられた。

前述のように、原因が多様であるにもかかわらず、最終的に DAD という一致した組織病変を形成するのは、その形成メカニズムが類似しているためと考えられている¹⁴⁾ (図 4)。DAD は I 型肺胞上皮又は毛細血管内皮が障害されることを起点とし、それにより生じる炎症促進因子によって惹起される炎症反応が、その本態であると示唆されている^{7),14)}。特に、肺胞マクロファージから放出される炎症促進性サイトカインが、好中球の遊走・

活性化、血管内皮の活性化を誘起し、その活性化好中球により放出される様々な物質が、さらに肺胞上皮や血管内皮を傷害することが、DAD における病変形成や病態に深く関与しているとされている¹⁴⁾。組織学的な最大の特徴として、肺胞を縁取るように硝子膜が形成されることが挙げられるが、厳密には病変の進行により 3 つの病期に分類される^{7), 15), 16)}。初期とされる滲出期は概ね 7 日以内で、硝子膜の形成が特徴であり、浮腫・うっ血を伴う。その後、増殖期に移行し、II 型肺胞上皮の増生が顕著になり、間質の肥厚を伴う線維芽細胞の増生がみられるようになる一方、硝子膜は減少・消失する。さらに進行した線維化期では、14 日以降は間質の線維化が高度に認められ、II 型肺胞上皮も残存する。本症例の肺では、び漫性に硝子膜の形成と II 型肺胞上皮の増生が高度に認められ、間質は線維芽細胞の浸潤を伴い肥厚していたことから、増殖期の初期であったと示唆された。

既報の BRSV 実験感染では、感染 2 日後にウイルス排泄が始まり、4 日後に排泄量が最大となり、10 日後までには消失するとされている。本症例の病性鑑定では、肺の一部位からのみ BRSV 遺伝子が検出され、BRSV の免疫染色で認められた陽性反応はごく少量であった。前述の組織所見を考慮すると、BRSV の排泄初期ではなく、消失過程の時期であったと考えられることから、本症例は BRSV 感染後 7~10 日程度の経過で死亡したと推察された。

BCoV 感染実験では、①単独で接種しても呼吸器症状は認められないか、鼻汁漏出程度であったこと、②他の呼吸器病の病原体と重感染を起こすと組織病変が形成され、かつ再分離されたこと、③この場合でも、肺実質は障害されず、病変やウイルスは気管～細気管支に留まっていたことが報告されている^{9),10),13)}。これらのことから、BCoV は本来、呼吸器に対する病原性が非常に弱く、さらに DAD を惹起しにくいと考えられる。本症例は、BCoV に暴露された時点で、既に *M. dispar* や BRSV の感染下であったことが、組織病変の形成に重要であったと考えられた。また、免疫染色の成績を考慮すると、本症例で BCoV による病変が形成されたのは、既報と同様に気管及び気管支であった。このことは、野外症例においても、呼吸器にマイコプラズマ等の他の病原体による影響下にある個体は、BCoV の感染により呼吸器病変を形成しうる、という点で、本ウイルスの呼吸器病における重要性を裏付けた症例であり、病理学的に特筆すべきことと考える。

ある感染実験によれば、BCoV 接種後の呼吸器粘膜における抗原量は経過とともに減少し、接種 4~6 日後には消失するとされる¹⁰⁾。また、障害を受けた呼吸器上皮は、1 日後には剥離し、2 日後には修復が開始される⁷⁾。本症例では、免疫染色で病変部に高度の陽性反応が認められたこと、気管及び気管支粘膜上皮の剥離は顕著であるものの、修復像はほぼ認められなかったことから、死亡時には、BCoV 感染後 1~2 日程度の経過あったと推察された。このことは同様に、BCoV が本症例の DAD に関与しなかったことを示唆している。

これまでの考察を総合すると、本症例は BRSV の感染により肺胞上皮が障害され、肺病変が DAD に発展したことで病態が重篤化したことに加え、さらに *M. dispar* の感染により易感染状態となったことで、BCoV が感染し、気管及び気管支が障害されたことが複合的に作用し死亡したと推察された(図 5)。また、当該群で発症した 8 頭のうち、本症例以外に重度の呼吸器症状を示した個体、死亡した個体はいなかったため、仮に BRSV に感染したとしても、DAD に発展するのはごく一部であると考えられる。

病性鑑定を通じ、当該農場の疫学情報、本症例の病理学的特徴、他の検査成績を踏まえ、当該群における発生要因を検索した。疫学情報は既述の通り、1 か月以上牛の移動はなかった。病理学的に、呼吸器以外の所見として、本症例の発育ステージで特に重要な免疫組織である、回腸パイエル板及び胸腺の発達が極めて不良であった。発生群では、1 週令未満の子牛でも呼吸器症状が認められ、これらの子牛からも BRSV 及び BCoV の特異遺伝子が検出された(データは示していない)。以上のことから、発生要因として、牛の導入に伴うウイルスの侵入は否定され、発生群における初乳給与をはじめとする新生子牛の飼養管理に問題があり、その結果として抗病性の低下を招いたことが発生の根底にあると推察された。

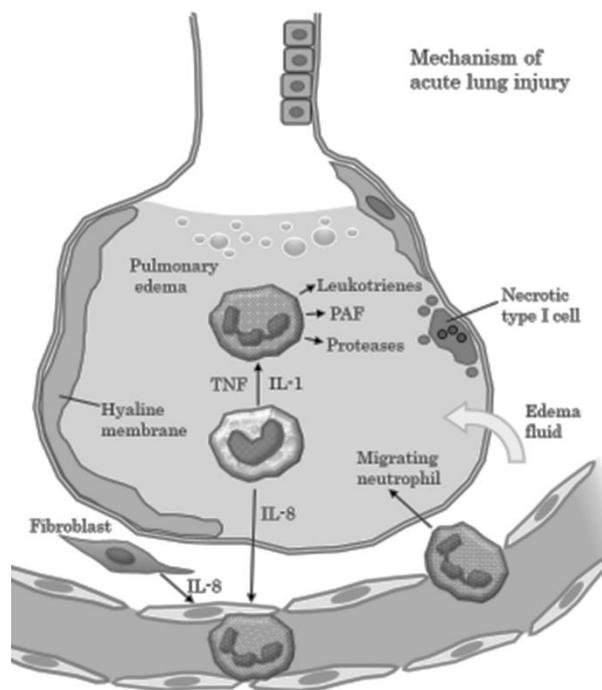


図 4 DAD 急性期の病理発生

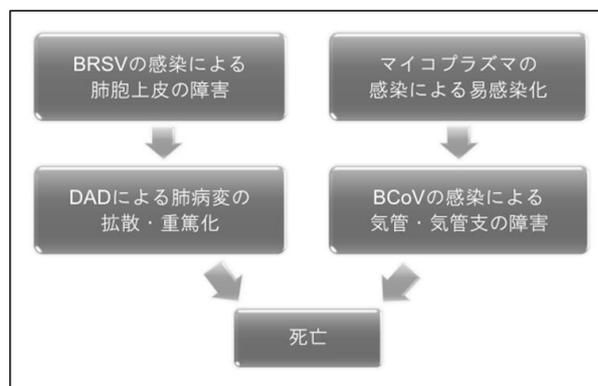


図 5 本症例の病態

参考文献

- 1) 勝田賢：牛呼吸器病症候群，牛病学第三版，300-303，近代出版，京都（2013）
- 2) Makoschey B., Catharina B. A. : Review on bovine respiratory syncytial virus and bovine parainfluenza - usual suspects in bovine respiratory disease - a narrative review, BMC Vet. Res., 17:261 (2021)
- 3) Rehmtulla A. J., Thomson R. G. : A review of the lesions in shipping fever of cattle, Can. Vet. J., 22, 1-8 (1981)

- 4) 綿村崇宏 : 牛の細菌性呼吸器病の病理, 家畜感染症学会誌, 7, 135-141 (2018)
- 5) 播谷亮 : 牛の呼吸器病の病理, 家畜感染症学会誌, 2, 85-97 (2013)
- 6) Campbell J. : Viral Infections Associated with Bovine Respiratory Disease Complex in Cattle, MSD Veterinary Manual (2022) <https://www.msdveterinary.com/respiratory-system/bovine-respiratory-disease-complex/viral-infections-associated-with-bovine-respiratory-disease-complex-in-cattle>
- 7) Caswell J. L., Williams K. J. : Respiratory System, Pathology of Domestic Animals 6th edition volume 2, 465-591, Elsevier, Missouri (2016)
- 8) Saif L. J. : Bovine respiratory coronavirus, Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract., 26(2), 349-64 (2010)
- 9) Ellis J., Erickson N., Gow S., West K., Lacoste S., Godson D. : Infection of calves with in-vivo passaged bovine parainfluenza-3 virus, alone or in combination with bovine respiratory syncytial virus and bovine coronavirus, Can. J. Vet. Res., 84(3), 163-171 (1982)
- 10) Soules K. R., Rahe M. C., Purtle L., Moeckly C., Stark P., Samson C., Knittel J. P. : Bovine Coronavirus Infects the Respiratory Tract of Cattle Challenged Intranasally, Front. Vet. Sci., 29(9), 878240 (2022)
- 11) Thomas L. H., Gourlay R. N., Stott E. J., Howard C. J., Bridger J. C. : A search for new microorganisms in calf pneumonia by the inoculation of gnotobiotic calves, Res. Vet. Sci., 33(2), 170-82 (1982)
- 12) Amoroso M. G., Lucifora G., Uberti B. D., Serra F., De Luca G., Borriello G., De Domenico A., Brandi S., Cuomo M. C., Bove F., Riccardi M. G., Galiero G., Fusco G : Fatal Interstitial Pneumonia Associated with Bovine Coronavirus in Cows from Southern Italy, Viruses, 12(11), 1331 (2020)
- 13) Reynolds D. J., Debney T. G., Hall G. A., Thomas L. H., Parsons K. R. : Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves, Arch. Virol., 85(1-2), 71-83 (1985)
- 14) Husain A. N. : Lung, Robbins Basic Pathology 10th edition, 495-548, Elsevier, Missouri (2017)
- 15) Butt Y., Kurdowska A., Allen T. C. : Acute Lung Injury: A Clinical and Molecular Review, Arch. Pathol. Lab. Med., 140(4), 345-350 (2016)
- 16) Hughes K. T., Beasley M. B. : Pulmonary Manifestations of Acute Lung Injury: More Than Just Diffuse Alveolar Damage, Arch. Pathol. Lab. Med., 141(7), 916-922 (2016)