

*Neospora caninum*が関与した流産多発事例の病理学的検索とPCRの活用

県央家畜保健衛生所

伊藤 咲	矢島 真紀子
海老澤 久美子	石川 由
猪瀬 早紀	高山 環
英 俊征	小菅 千恵子
近田 邦利	仲澤 浩江

はじめに

ネオスポラ症は、Apicomplexa（門）に属する細胞内寄生性原虫の*Neospora caninum*（以下、N. c）の感染によって起こる疾病であり、家畜伝染病予防法上、牛及び水牛で届出伝染病に指定されている¹⁾。本疾病は世界各国で発生が報告されており、日本では、1990年代初めに牛の流産や異常産の原因として報告されて以来、季節を問わず全国的な発生が認められている。

N. cの終宿主はイヌ科の動物で、それらの糞便と共にオーシストが排出される。中間宿主である牛、綿羊、山羊等はオーシストに汚染された水や餌の経口摂取で感染する。中間宿主間では垂直感染を起こし、多くは先天性感染個体として生まれ妊娠時に流死産を繰り返すが、一部は胎齢3～8ヵ月での流産やミイラ化して娩出される^{2,3)}。剖検所見では、皮下の膠様浸潤や胸水腹水の貯留が認められ、組織所見では中枢神経系、心臓及び骨格筋等に非化膿性の炎症細胞浸潤、肝臓等で巣状壊死等が認められ、これらの病理組織学的検査及び免疫組織化学検査（以下、IHC）をもってネオスポラ症の診断を行う¹⁾。

今回、令和6年6月～8月に同一農場で継続してネオスポラ症の発生があったため、病性鑑定の概要を報告する。

発生の概要

県内の乳肉複合農家（乳牛32頭、肉用繁殖牛111頭、肥育牛364頭）において令和5年12月頃から流産が多数発生しており、令和6年6月10日（1例目）、令和6年6月21日（2例目）、令和6年8月10日（3

例目) に発生した乳牛での流産3例について、原因究明のため病性鑑定を実施した。

材料と方法

1 材料

流産胎子 (1~3 例目)、母牛血清 (1~3 例目) 及び母牛膣スワブ (1、2 例目) を供試した。

2 方法

(1) 細菌学的検査

1、2 例目では胎子の主要臓器、胃内容及び母牛膣スワブについて 5% 羊血液寒天培地 (37℃、24~48 時間、好気及び微好気)、DHL 寒天培地 (37℃、24~48 時間、好気)、Skirrow 培地 (肝臓・肺・胃内容・膣スワブのみ、37℃、5 日間、微好気) での分離培養を実施した。分離菌については市販キット「API® 20 E」または「API® 20 STREP」により同定した。なお、2 例目については、E S II サルモネラ寒天培地 (37℃、24~48 時間、好気) も併せて実施した。3 例目は死後変化が著しいため検査は実施しなかった。

(2) ウイルス学的検査

ア 遺伝子学的検査

1、2 例目の肝臓、腎臓、脾臓、母牛膣スワブ及び血清について RT-PCR 法により、ペスチウイルス遺伝子検索を実施した。3 例目は死後変化が著しいため検査は実施しなかった。

イ 中和抗体検査

1、2 例目の胎子腹水及び母牛ペア血清についてアカバネ病、イバラキ病、チュウザン病、アイノウイルス感染症、牛流行熱及び BVDV 1 型・2 型の中和抗体試験を実施した。

ウ ウイルス培養試験

1、2 例目の肝臓、脾臓、腎臓、肺、脳及び母牛膣スワブについて Hm1u-1 細胞、MDBK-SY 細胞及び MDBK 細胞を用い、10% FBS 加 MEM、5% CO₂、37℃ の条件で 7 日間培養を 3 代継代した。3 例目は死後変化が著しいため検査は実施しなかった。

(3) 寄生虫学的検査 (抗体検査)

1～3 例目の母牛血清について E L I S A 法により N. c 抗体検査を実施した。

(4) 病理学的検査

ア 病理解剖学的検査

流産胎子 3 例について外貌検査及び剖検を実施した。

イ 病理組織学的検査

心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、胃、腸管、舌、骨格筋、脳、脊髄、胎盤（3 例目のみ）について、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、定法に従いパラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色を実施した。

ウ 免疫組織化学検査

1、2 例目の心臓、肝臓、腎臓、舌、骨格筋、脳及び、3 例目の舌について抗 N. c 家兔血清（農研機構 動物衛生研究部門より分与）を用いて I H C を実施した。

結果

1 細菌学的検査

1 例目の肝臓及び脾臓から *Pantoea* spp、母牛膣スワブから *Streptococcus* 属菌が分離された。2 例目の肺、胃内容及び母牛膣スワブから *Streptococcus* 属菌が分離された。

2 ウイルス学的検査

(1) 遺伝子学的検査

1、2 例目の肝臓、腎臓、脾臓、母牛膣スワブ及び血清から、ペスチウイルス特異遺伝子は検出されなかった。

(2) 中和抗体検査

1、2 例目の胎子腹水及び母牛ペア血清について、各疾病とも抗体価は 2 倍未満だった。

(3) ウイルス培養試験

1、2 例目の肝臓、脾臓、腎臓、肺、脳及び母牛膣スワブから、C P E を示すウイルスは分離されなかった。

3 寄生虫学的検査（抗体検査）

1～3 例目の母牛血清全てで、抗体は陽性だった。

4 病理学的検査

(1) 病理解剖学的検査

1、2 例目は共に胎齢 5 ヲ月で胸水・腹水の貯留、3 例目は胎齢 7 ヲ月でミイラ化を認めたが、その他体型異常及び中枢神経系の形成異常は認められなかった（写真 1～3）。ミイラ化していた 3 例目の各臓器は水分が抜け弾力があり、全て同一色を呈していた。



写真 1 1 例目の外貌



写真 2 2 例目の外貌



写真 3 3 例目の外貌

(2) 病理組織学的検査及び IHC

1 例目では、心外膜の全周囲にリンパ球が浸潤し、正常の心外膜と比較すると顕著に肥厚していた。また、内腔に向かうにつれ心筋に核の消失や好酸性の上昇など死後変化が強く認められた（写真 4）。舌では筋線維間や、結合組織間にリンパ球の浸潤を少量認め、過去に本県で発生し

たネオスポラ症の症例と比較すると、リンパ球や形質細胞の浸潤が少なく、比較的軽度な病変だった（写真 5）。骨格筋においても舌と同様に筋線維間に少量のリンパ球の浸潤を認めたが、過去の症例と比較すると、細胞浸潤はごく軽度で筋線維自体の傷害も軽度だった（写真 6）。脳では小膠細胞が巣状に集簇したグリア結節が認められた（写真 7）。ネオスポラ症は中枢神経での非化膿性炎症が多く認められる⁴⁾ことから、脳の複数カ所からパラフィン包埋ブロックを作成し鏡検したが、病変がみられたのは1か所のみだった。

病変を認めた心臓、舌、骨格筋、脳及びIHC検出率が高いとされる⁵⁾腎臓、肝臓について抗N. c家兔血清を用いてIHCを行ったところ、心臓及び舌で陽性抗原を認めた（写真 4 及び 5 の左下挿入図）。

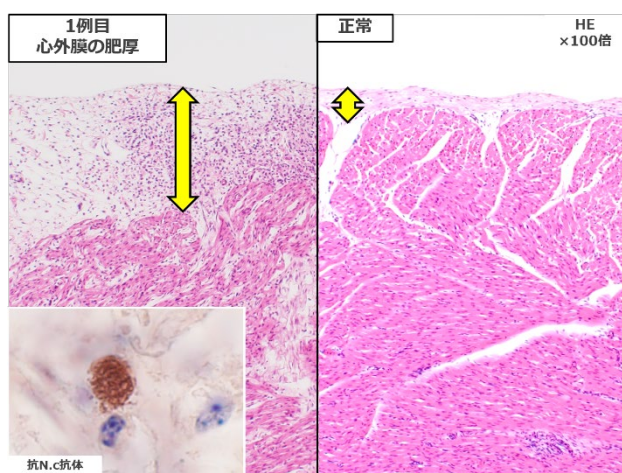


写真 4 心外膜の肥厚

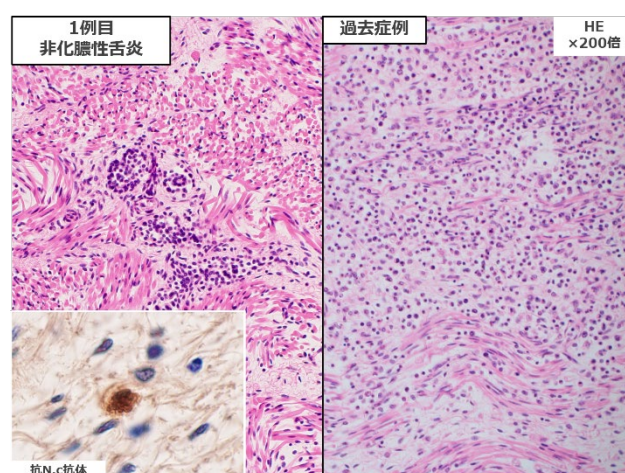


写真 5 舌のリンパ球浸潤

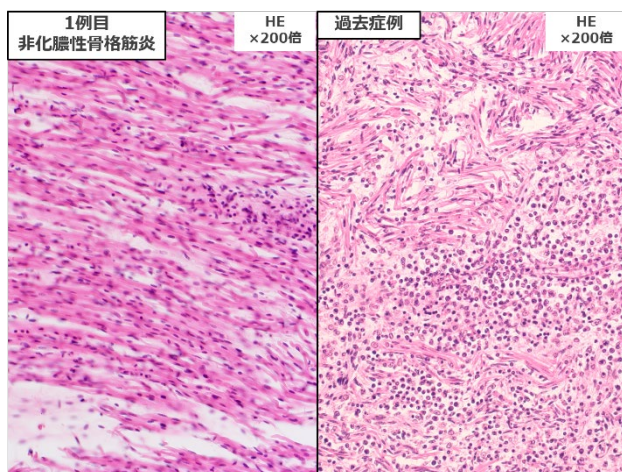


写真 6 骨格筋のリンパ球浸潤

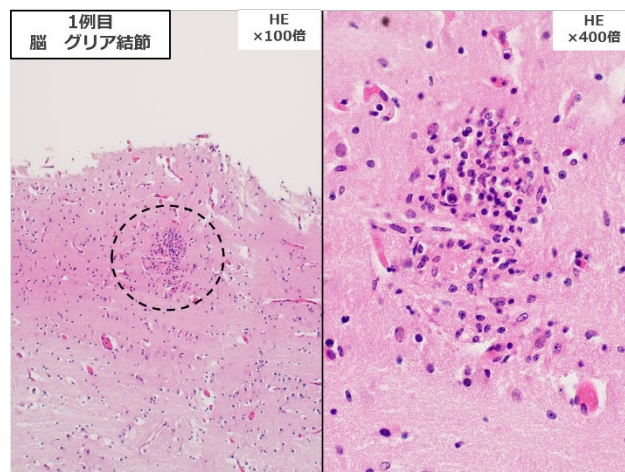


写真 7 脳のグリア結節

2 例目では、心外膜で1 例目より重度のリンパ球の浸潤による肥厚を認め、心筋の死後変化は同程度認めた。脳では、壊死巣に一致してグリア結節を認めた（写真 8）。舌ではリンパ球の浸潤はほとんど認められなかった。心臓、肝臓、腎臓、舌、骨格筋、脳について、抗N. c 家兔血清を用いてIHCを行ったところ、心臓及び舌で陽性抗原を認めた（写真 8 の左下挿入図）。

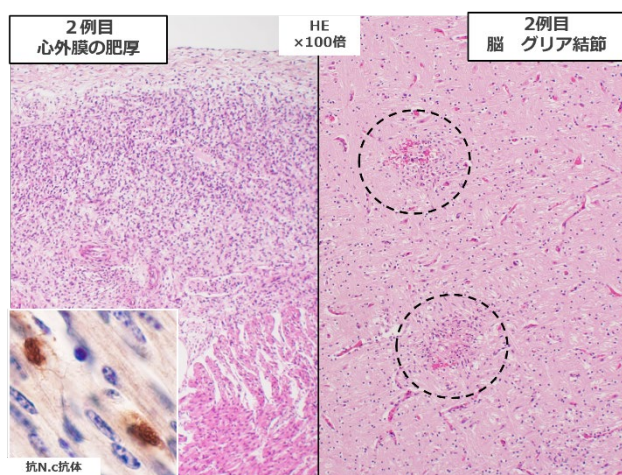


写真 8 左：心外膜の肥厚、右：グリア結節

3 例目では、ミイラ化による死後変化で組織評価が困難だったが、心外膜に核を消失した細胞の浸潤が認められた（写真 9）。また、胎盤では、絨毛膜に好中球を中心とした炎症細胞浸潤が認められた（写真 10）。

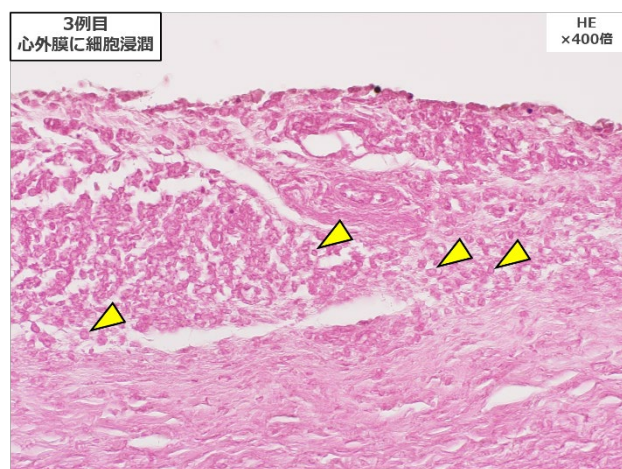


写真 9 心外膜の細胞浸潤（矢頭）

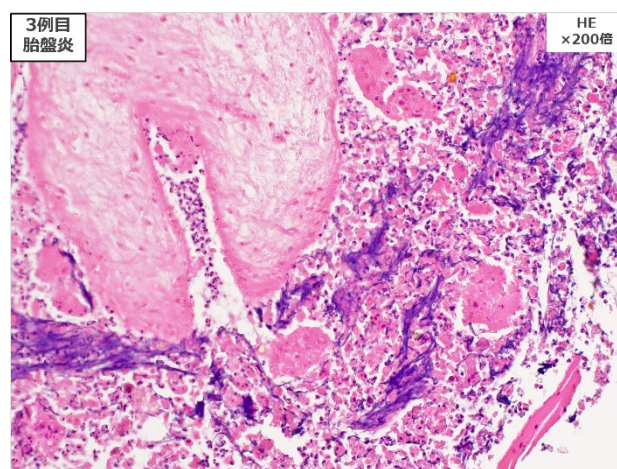


写真 10 胎盤に炎症細胞の浸潤

以上の結果から、1、2 例目は共に組織学的所見及び I H C 陽性抗原を認めたことから、ネオスポラ症と診断したが、過去の症例と比較して心外膜の肥厚以外の組織病変が軽度であり、I H C 陽性像も少ない傾向にあった。また、3 例目は死後変化により組織評価が困難であり、病理組織検査での疾病診断に至らなかった（表 1）。

表 1 1～3 例目の病理組織所見比較

		脳	舌	心臓	骨格筋	肝臓	腎臓	脾臓
1例目	組織病変	+	+	++	+	+	-	-
	IHC	-	+	+	-	-	-	-
2例目	組織病変	+	-	++	-	-	-	-
	IHC	-	+	+	-	-	-	-
3例目	組織病変	-	-	±	-	-	-	-
	IHC	NT	-	NT	NT	NT	NT	NT
過去症例	組織病変	+	+++	++	+++	-	-	-
	IHC	++	+	+	+++	NT	+	NT

追加検査

今回の症例では、疫学情報や抗体検査結果からネオスポラ症を疑うものの、ミイラ化等の死後変化で病理評価が困難な検体や、組織病変が軽度な臓器が認められた。そこで、胎子情報を補完する目的で追加検査を実施した。

1 材料と方法

流産胎子 1～3 例目の脳、心臓、腎臓及びパラフィン包埋材料（以下、F F P E）を用いて、Esther らの方法⁶⁾により、N c 5 遺伝子及び 2 8 S r R N A を標的としたリアルタイム P C R 法による遺伝子検索を実施した。

2 結果

1 例目の脳、心臓及び腎臓、2 例目の脳及び心臓、3 例目の腎臓から N . c 特異遺伝子が検出された（表 2）。以上の結果から 3 例目についても、組織評価は困難であったが、胎子臓器から N .

c 特異遺伝子が検出されたこと、母牛がN. c 抗体を保有していたことから、より強くネオスポラ症が疑われた。

表 2 リアルタイム PCR 結果

	1例目			2 例目			3例目		
	FFPE	生材料	IHC	FFPE	生材料	IHC	FFPE	生材料	IHC
脳	+	+	-	+	+	-	-	-	NT
心臓	+	NT	+	-	+	+	-	-	NT
腎臓	-	+	-	-	NT	-	+	-	NT

まとめ及び考察

今回、流産が多発した乳肉複合農家において、流産 3 例の病性鑑定を実施した。1、2 例目は典型例や過去症例と比較し病変は軽度であったが、IHC 陽性であったことからネオスポラ症と診断した。3 例目は母牛の抗体検査結果及び疫学情報からネオスポラ症を疑ったものの、ミイラ化により病理評価は困難だった。そこで、胎子情報を補完するため、新たにリアルタイムPCR検査を導入し実施したところ、N. c 特異遺伝子が検出されたことから、ネオスポラ症をより強く疑うことができた。

従来、本県では病理組織検査で判断不能な場合は、抗体検査及び疫学情報からネオスポラ症を疑うのみであったが、今回の症例のように、ネオスポラ症を診断する上で、判断材料のひとつとして、PCR 検査及び抗体検査を併用することは有効であると考えられる。

今後、病理評価が困難なネオスポラ症を疑う症例や組織病変が軽度な症例では、補助的検査として抗体検査に加え、リアルタイムPCR検査を併用し総合的に判断していきたい。

引用文献

- 1) 病性鑑定指針（平成 27 年 3 月 13 日付 26 消安第 4686 号農水省消費・安全局長通知），98-100
- 2) 明石博臣：牛病学第 3 版，近代出版，332-335（2013）
- 3) Stephen, J. G. *et al*：J. Mole. Epid. 13, 133-150（2013）
- 4) 山田美那子：平成 26 年度大分県家畜保健衛生所業績発表会集録，演題 11
- 5) 播谷亮：家畜衛生研究成果情報，14，9-10（2001）

6) Esther, C. F. *et al* : J.Cline. Microbial. 1194-1198 (2002)