

# 10. 牛ウイルス性下痢ウイルス感染牛における 免疫組織化学的及び病理組織学的検索

大分家畜保健衛生所

○病鑑 佐藤亘、病鑑 首藤洋三、病鑑 山田美那子

## 【はじめに】

牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）感染牛は、異常産、粘膜病発症、持続感染など多様な病態を示し、中でも持続感染牛（PI牛）の摘発は、本病の防疫上、特に重要とされている。しかし、PI牛はBVDVに対して免疫寛容を示すことから抗原に対する細胞反応が乏しく、このため特徴的所見に欠けることなどから、病理組織学的診断は困難とされてきた。また、BVDVは遺伝的多様性に伴って血清学的な多様性を示す<sup>1), 2)</sup>ことから、国内では安定した免疫組織化学的染色（IHC）の結果は得られておらず、その抗原分布と病態については不明な点が多い。

今回、県内にて発生したBVDV感染牛について、多様な株に対して安定した結果が得られるIHCの染色条件について検討し、PI牛を主とするBVDV感染牛の特徴所見と抗原分布、病態との関連について調査したので報告する。

## 【材料および方法】

### 1 ウイルス学的検査

2005年4月から2009年9月の病性鑑定事例にて、粘膜病発症牛（発症牛）及びPI牛から分離されたBVDV19株について、牛胎子筋肉細胞を用いた細胞病原性の確認、BVDV遺伝子における5' -UTR領域及びE2領域の分子系統樹解析（動物衛生研究所）による遺伝子型別を行った。

### 2 IHC法の検討

ウイルス学的検査成績をもとに、BVDV I a型による発症牛とBVDV II a型による発症牛、各1頭を供し、双方にて安定した結果の得られる一次抗体の選定と染色条件の検討を行った。

一次抗体の選定には、ウイルス中和試験、間接蛍光抗体法、凍結切片におけるIHCなどで、BVDV1型及び2型に広い交差性が確認されている、抗BVDVマウスモノクローナル抗体Cell line D89（VMRD）<sup>3), 4)</sup>または抗BVDVマウスモノクローナル抗体Cell line 348（VMRD）<sup>5), 6)</sup>を用いて、アミノ酸ポリマー法によるIHCを行い、その染色態度から使用抗体を選定した。

染色条件は、染色法を酵素抗体（SAB）法またはアミノ酸ポリマー法（ポリマー法）、選定した一次抗体の反応を室温または37℃にて1時間として、両者の組み合わせにより4区を設定した。これらの染色態度から、特異的染色と非特異的背景の差が最も明瞭となる条件を至適染色条件として設定した。

### 3 免疫組織化学的及び病理組織学的検査

材料として、ウイルス学的検査に供した病性鑑定事例のうち、病理解剖を行った発症牛4頭、PI牛10頭を供した。

病理組織学的検査は、実質臓器、大脳から延髄の中樞神経系、消化管、副腎、皮膚

について10%中性ホルマリン固定・パラフィン包埋標本を作製し、HE染色により共通所見の検索を行った。

免疫組織化学的検査は、IHC法の検討にて得られた至適染色条件にて染色し、BVDV抗原の分布と病理組織学的所見との関連について検討した。

## 【成績】

### 1 ウイルス学的検査

県内にて19頭から分離されたBVDVは、11頭がIa型、1頭がIb型、7頭がIIa型の遺伝子型に分類され、年次別推移では、BVDV感染牛は年々増加し、その遺伝子型も多様化する傾向が見られた。また、摘発されたPI牛の多くは、発症牛が発生した後の同居牛全頭検査にて摘発されたものであった。

(図1)

### 2 IHC法の検討

一次抗体の選定では、BVDV Ia型発症牛については、両抗体ともに良好な結果が得られた。BVDV IIa型発症牛については、Cell line D89では特異的染色像と非特異的背景に明瞭な差が見られず、Cell line 348を使用することで比較的明瞭な結果が得られた。本成績をもとに、BVDV IIa型発症牛について、より明瞭な染色像を得ることを目的として染色条件の検討を行った。その結果、染色法をポリマー法とし、一次抗体 (Cell line 348) を37°Cで1時間反応させることで、より明瞭な染色像を得ることができた。

(表1)

### 3 免疫組織化学的及び病理組織学的検査

発症牛の舌や消化管では、広範囲の粘膜における潰瘍の形成、十二指腸から回腸における粘膜絨毛の壊死または線維化、パイエル板リンパ球の減数と脱落、壊死、線維化と、これに伴う陰窩ヘルニアの形成など、粘膜病発症牛にて特徴的とされる所見が得られ、一方、PI牛では陰窩膿瘍形成を伴う慢性腸炎像が高率に観察された。同部位のIHCでは、発症牛の病変部を主とする粘膜上皮細胞では高度な陽性像が

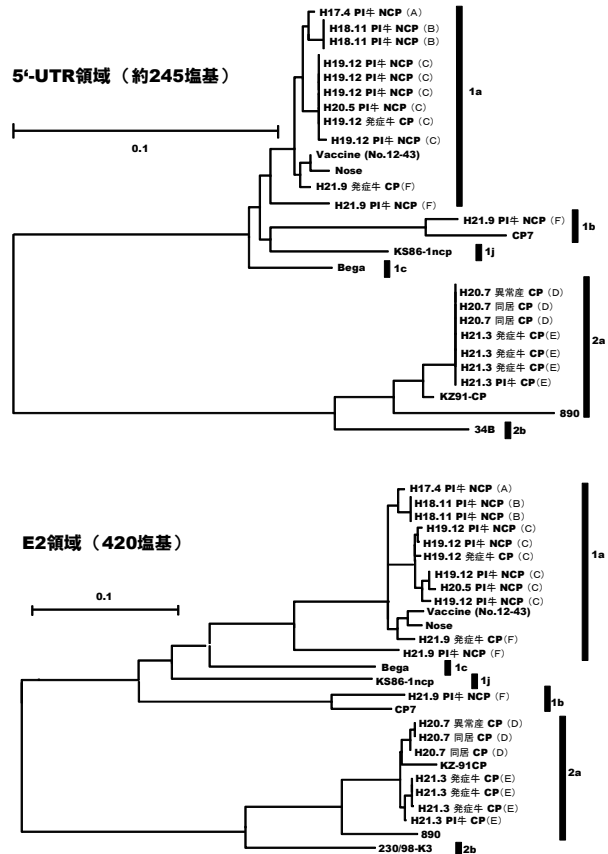


図1 ウイルス学的検査成績

表1 免疫組織化学的染色法の検討成績 (一次抗体の選定)

一次抗体の選定			抗体希釈倍率			
検体	抗体	染色の強さ	×25	×50	×100	×200
Ia型発症牛	D89	特異的染色	+++	+++	+++	+
		非特異的背景	+++	+	±	-
IIa型発症牛	D89	特異的染色	+++	++	+	-
		非特異的背景	+++	+	-	-
Ia型発症牛	348	特異的染色	+++	+++	+++	+
		非特異的背景	+++	+++	±	-
IIa型発症牛	348	特異的染色	+++	+++	++	+
		非特異的背景	+++	++	±	-

染色条件の検討: IIa発症牛・Mab348使用			抗体希釈倍率			
染色法	抗体反応	染色の強さ	×25	×50	×100	×200
ポリマー法	37°C	特異的染色	+++	+++	+++	++
		非特異的背景	++	±	±	-
SAB法	37°C	特異的染色	+++	+++	++	+
		非特異的背景	+++	++	±	±
ポリマー法	室温	特異的染色	+++	+++	++	+
		非特異的背景	+++	++	±	-
SAB法	室温	特異的染色	+++	++	±	-
		非特異的背景	+++	++	±	-

観察されたが、病変形成が見られない部位では、発症牛、PI牛ともに陽性像は極少数であった。また、全症例に共通して、パイエル板や間質の単核系細胞、粘膜下組織の血管内皮細胞にも陽性像が多数認められた。

中枢神経系では、大脳から延髄の血管周囲に、グリア細胞による囲管性細胞浸潤が全頭で共通して観察された。IHCでは、陽性像は血管内皮細胞や浸潤した単核系細胞の細胞質に散見されたが、囲管性細胞浸潤の程度と抗原量の間に関連は見られなかった。また、広範囲の神経細胞に顆粒状の弱陽性像も観察された。(図2)

実質臓器では、個体により間質性肺炎、肝臓における出血を伴う壊死なども観察された。IHCでは、肺胞中隔に浸潤した単核系細胞や肺胞上皮細胞、肝臓小葉間結合組織の単核系細胞や血管内皮細胞に陽性像が観察され、これらは病変部で多い傾向にあった。一方、腎臓では軽度の間質性腎炎、心臓では軽度の心筋細胞の変性が観察されたが、病変と抗原局在に関連は見られず、腎臓では、間質に浸潤した単核系細胞、糸球体メサンギウム細胞、尿細管上皮などに、心臓では中血管内皮及び中皮に陽性像が観察された。

(図3)

リンパ組織では、濾胞リンパ球の減数や壊死が高率に観察された。IHCでは、脾臓では赤脾髄の単核系細胞に多数の陽性像が観察され、腸間膜リンパ節では散在性に、胸腺では髄質の単核系細胞を主として陽性像が散見された。(図3, 4)

その他の特徴的陽性像としては、副腎の血管や球状帯、束状帯、網状帯の実質細胞に病変を伴わずに陽性像が多数観察され、耳介皮膚の毛包や単核系細胞にも陽性像が観察された。

(図4)

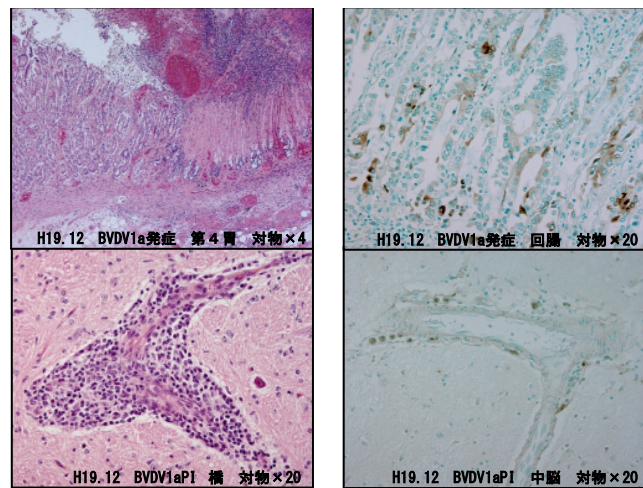


図2 病理組織学的・免疫組織化学的検査成績

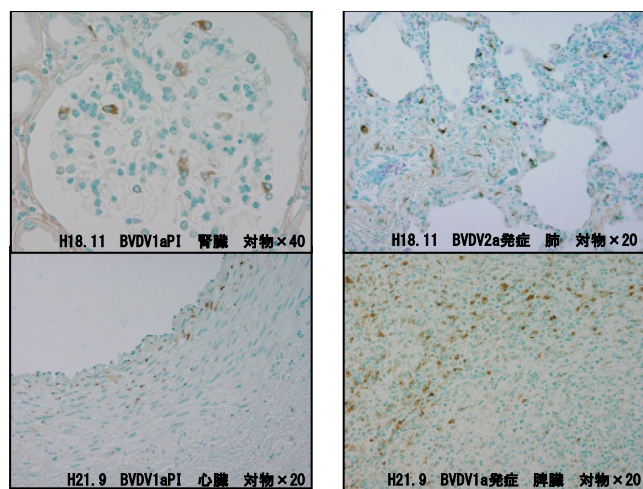


図3 病理組織学的・免疫組織化学的検査成績

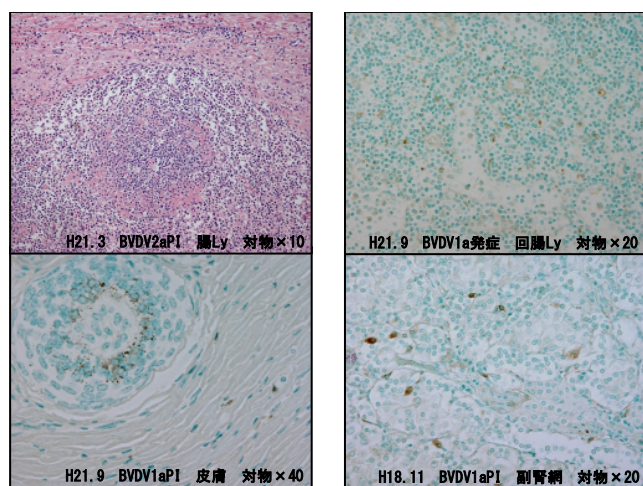


図4 病理組織学的・免疫組織化学的検査成績

これらの所見を一覧として表2にまとめた。消化管における粘膜病の特徴的所見を除き、BVDVの遺伝子型や細胞病原性と病変の間には関連は見られず、発症牛とPI牛の共通所見として、中枢神経系における囲管性細胞浸潤、陰窩膿瘍形成を伴う慢性腸炎像が高率に観察された。特に中枢神経系の囲管性細胞浸潤については、全個体に共通して観察されていることから、BVDV感染牛における特徴的病変と考えられた。(表2)

さらにIHCによって得られたBVDV抗原分布と病変との関連を表3に示した。IHCは、BVDVの遺伝子型や細胞病原性に関係なく全頭で安定した結果が得られており、抗原の局在は、全身の血管と単核系細胞への分布が特徴的であった。肺、肝臓、脾臓では、間質性肺炎、出血を伴う壊死巣周辺部に浸潤した単核系細胞に陽性抗原の局在が確認され、形成された病変と抗原分布との間に関連があることが示唆された。また、中枢神経、心臓、腎臓、脾臓壊死部以外のリンパ組織では、病変は観察されたが抗原局在との関連性は低く、副腎、皮膚、脾臓では、著変は認められずにIHCにおいて抗原のみ観察された。また、消化管粘膜上皮細胞では、発症牛病変部のみで高度な抗原分布が見られ、病変形成がない部位では発症牛、PI牛ともに陽性像は極少数であった。(表3)

### 【まとめ・考察】

PI牛は、胎子の免疫機能が確立される前に、母牛がBVDVの非細胞病原性株に感染することで発生し、娩出された子牛はBVDVに対して免疫寛容を示すため、粘膜病発症により死亡するまでウイルスを排泄し続ける。このためPI牛の摘発は、本病の防疫上、特に重要とされているにも関わらず、BVDVに対する免疫反応の欠如から特徴的炎症反応に乏しく、病理組織学的診断は困難とされてきた。また、BVDVは生物型で細胞病原性株と非細胞病原性株に、遺伝子型でI型とII型に大きく分類され、遺伝子型に伴って多様な抗原性を示すことから、国内では、多様な株に対して安定した結果の得られるIHCの検討はされておらず、PI牛の診断には活用されていない。

県内発生事例より分離されたBVDVについて行ったウイルス学的検査では、BVDV感染の増加傾向と分離株の多様化が示唆され、摘発されたPI牛の殆どは発症牛が発生した後の同居牛検査にて摘発されたものであったことなどから、通常の病性鑑定業務の中でPI牛を摘発で

表2 病理組織学的検査成績(共通所見一覧)

症状の区分 BVDV細胞病原性	発症牛 CP (4)		持続感染牛 NCP (10)		Total
	Ia (2)	IIa (2)	Ia (9)	Ib (1)	
BVDV遺伝子型					
病理組織学的検査					
・中枢神経(大脳～延髄)	2/2	2/2	9/9	1/1	14/14
・囲管性細胞浸潤	1/2	0	3/9	0	4/14
・グリア結節					
・肝臓	2/2	0	1/9	0	3/14
・壊死巣形成					
・脾臓	2/2	1/2	4/9	0	7/14
・濾胞リンパ球減少壊死					
・腎臓	2/2	0	2/9	0	4/14
・間質性肺炎					
・心臓	0	0	2/9	0	2/14
・心筋変性					
・肺	0	2/2	3/9	1/1	3/14
・間質性肺炎					
・胸腺	0	0	1/9	1/1	2/14
・リンパ球減少					
・腸Lp	2/2	2/2	4/9	1/1	9/14
・リンパ球減少					
・消化管(舌～空回腸)					
・慢性腸炎	2/2	2/2	7/9	1/1	12/14
・陰窩膿瘍	2/2	2/2	7/9	0	11/14
・粘膜病	2/2	2/2	0	0	4/14
・陰窩ヘルニア	0	1/2	0	0	1/14

表3 免疫組織化学的検査成績(主病変と抗原局在の関連性)

主要病変	関連	実質細胞	間質細胞	免疫系細胞
・肺	間質性肺炎	○	肺胞上皮	中隔単核細胞
・肝臓	出血・壊死	○	—	間質単核細胞
・脾臓	出血・壊死	○	—	赤脾髄単核細胞
・大脳～延髄	囲管性細胞浸潤	×	神経細胞	グリア細胞
・胸腺	リンパ球減少	×	—	濾胞リンパ球
・腸Lp	リンパ球減少	×	—	単核系細胞
・心臓	心筋変性	×	—	間質単核細胞
・腎臓	間質性肺炎	×	糸球体メサンギウム 尿管上皮	間質単核細胞
・副腎	—	×	皮質実質細胞	間質単核細胞
・皮膚	—	×	毛包細胞	間質単核細胞
・脾臓	—	×	—	—
・舌～空回腸	粘膜病所見 (発症牛のみ)	○	粘膜上皮 (発症牛のみ)	間質単核細胞 パイル板リンパ球

きるよう、共通所見の把握と、それが観察された場合に抗原を証明できるIHCの検討が急務であると考えられた。

多様なBVDV感染牛について安定したIHCの成績を得ることを目的として、広範囲のBVDVに交差性が確認されている2つのモノクローナル抗体を比較して使用する一次抗体を検討し、IHCを検討した結果、抗BVDV I & II マウスモノクローナル抗体Cell line 348 (VMRD) を一次抗体として37°Cで1時間反応させ、アミノ酸ポリマー法にてIHCを行うことで、国内では未だ報告されていなかった、多様な株で安定したIHCの染色像を得ることができ、BVDV感染牛の病変と抗原の局在を確認することが可能となった。この結果を受け、県内で発生したBVDV感染牛14頭（発症牛4頭、PI牛10頭）について免疫組織化学的検査及び病理組織学的検査を行い、病理組織学的診断の基礎となる共通所見と、IHCで確認された抗原分布と病態の関連について検討するものとした。

その結果、全頭に共通して中枢神経系における囲管性細胞浸潤が観察され、本病変はPI牛における特徴的所見と考えられた。一方、IHCでは病変の程度と抗原分布との間には関連は認められず、本病変はウイルス抗原に対する反応ではないものと考察した。同様に囲管性細胞浸潤が観察されるアルボウイルスによる牛異常産では、抗原は主に神経細胞やグリア細胞に分布し、血管に観察される囲管性細胞浸潤像とは必ずしも一致しない。BVDVに観察された病変は、アカバネ病などのウイルス性異常産と同様の理由で、抗原量と一致しない病変が観察されたものと考えられ、これらは、血管浸透圧の亢進、障害を受けた神経組織の修復などに対して誘起された細胞反応であるものと推察された。

全身の血管や単核系細胞、副腎では、病変形成を伴わない抗原分布が認められ、これらの部位に感染したBVDVがサイトカインや内分泌系に影響を与えた結果、PI牛で特徴とされる易感染性や発育不良に繋がっているものと考えられ、培養細胞上ではCPEを示さない非細胞病原性株もPI牛における病態発現に関与しているものと推察された。

消化管では、発症牛特有の抗原分布として空回腸の粘膜上皮細胞に強陽性像が観察され、粘膜病を形成する細胞病原性株は、腸粘膜に対する親和性も高いものと考えられた。

その他では、肺、神経組織、腎臓などへの抗原分布も確認されたが、呼吸器症状や神経症状、腎機能不全を呈した牛からBVDVの非細胞病原性株が分離された報告はなく、細胞病原性株による病態の報告のみ見られる<sup>7), 8)</sup>ことから、これらの病態は、BVDVの中でも細胞病原性株が感染することで初めて病態発現に繋がるものと考察された。

また、皮膚においても抗原が明瞭に観察され、IHCは、海外にて活用される皮膚生検（イヤノッチ）によるPI牛摘発<sup>9)</sup>に活用できるものと考えられた。

今回、国内では報告されていなかったPI牛の特徴所見を把握でき、それにIHCを併用することによって、易感染性から他の疾病にて死亡する事の多いPI牛を、病性鑑定業務の中で病理組織学的に診断し、摘発することが可能であると考えられた。また、国内では確立されていなかった多様な株に対応するIHCが可能となったことで、皮膚生検による迅速なPI牛摘発や、BVDV感染牛における病態解明に寄与できるものと考えられた。

## 参考文献

- 1) Kameyama, K., Sakoda, Y.: 牛ウイルス性下痢ウイルスによる病態発現: J. Vet. Med. Sci. 60, 818-822, 2007

- 2) Keita Matsuno, Yoshihiro sakoda Genetic and pathological Characterization of Bovine Viral diarrhoea Viruses Recently Isolated from cattle in Japan: *J. Vet. Med. Sci.* 69(5), 515-520, 2007
- 3) Mary L Vickers, Harish C. Minocha. :Diagnosis of bovine viral diarrhoea virus infection using monoclonal antibodies: *J Vet Diag Invest*:2, 300-302, 1990
- 4) Dirk Deregt, Siv Prins. :A monoclonal Antibody-based Immunoperoxidase Monolayer (Micro-Isolation) Assay for Detection of Type 1 and Type 2 Bovine Viral Diarrhoea Viruses: *Can J Vet Res.* 62, 152-155, 1998
- 5) Dirk Deregt, Siv Prins. :Monoclonal Antibodies to the p80/125 and gp53 Proteins of Bovine Viral Diarrhoea Virus: Their Potential Use as Diagnostic Reagents: *Can J Vet Res.* 54, 343-348, 1990
- 6) W. XUE, F. BLECHA: Antigenic Variations in Bovine Viral Diarrhoea Viruses Detected by Monoclonal Antibodies: *Journal of Clinical Microbiology.* 28(8), 1688-1693, 1990
- 7) Calvin W. Booker, Sameeh M. Abutarbush: Microbiological and histopathological findings in cases of fatal bovine respiratory disease of feedlot cattle in western Canada: *Can Vet J.* 49, 473-481, 2008
- 8) U. Blas-Machado, J. T. Saliki: Bovine Viral Diarrhoea Virus Type 2-Induced Meningoencephalitis in Heifer: *Vet Pathol.* 41, 190-194, 2004
- 9) Hilbe M, Arquitt A: Immunohistochemical diagnosis of persistent infection with Bovine Viral Diarrhoea Virus on skin biopsies: *Schweiz Arch Tierheilkd.* 149(8), 337-344, 2007