

*Mortierella wolfii* 感染による新生子牛の壊死性小脳炎山本敦子<sup>1)†</sup> 信本聖子<sup>2)</sup> 小林亜由美<sup>3)</sup> 和田好洋<sup>3)</sup>稲垣華絵<sup>3)</sup> 花房泰子<sup>4)</sup> 芝原友幸<sup>4)</sup>

- 1) 北海道日高家畜保健衛生所 (〒056-0003 日高郡新ひだか町静内旭町2-88-5)  
 2) 北海道十勝家畜保健衛生所 (〒089-1182 帯広市川西町基線59-6)  
 3) 北海道石狩家畜保健衛生所 (〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘3)  
 4) ㈱農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2014年9月3日受付・2014年10月30日受理)

## 要 約

北海道内の黒毛和種牛飼養農場で、子牛1頭が出生直後から起立不能、後弓反張及び意識混濁等の神経症状を呈し、生後3日目で死亡した。剖検では、小脳の大部分の領域で出血と軟化が認められた。肝臓及び腎臓に白色結節が散見され、脾臓に赤色結節が1カ所みられた。組織学的に、小脳では出血性壊死性炎症がみられ、病変部には多数の真菌がみられた。肝臓、腎臓及び脾臓には壊死を伴う真菌の増殖と肉芽腫の形成がみられた。真菌の形態と、小脳病変部のパラフィン切片から得られたDNAサンプルを用いた分子生物学的解析の結果より、本真菌は *Mortierella wolfii* (*M. wolfii*) と同定され、本症例は新生子牛の *M. wolfii* 感染症と診断された。

——キーワード：*Mortierella wolfii*, 壊死性小脳炎, 新生子牛。

----- 日獣会誌 68, 112~116 (2015)

*Mortierellales* (クサレケカビ目) 真菌は、以前は *Mucorales* (ケカビ目) に分類されていたが、分子生物学的解析等の結果、近年は新たに独立目として取り扱われている [1]。 *Mortierella* 属真菌はおもに森林土壌に生育し、このなかで唯一病原性を示すのが *Mortierella wolfii* である [2]。

これまで *M. wolfii* 感染症は母牛 [3-10] で多く報告されているが、子牛 [7, 9, 10] の報告は比較的少ない。発症牛にみられた臨床症状としては、流産 [3, 6-10]、神経症状 [3, 8, 9]、呼吸器症状 [4, 9] 及び全身感染症 [3, 11] としての報告がある。病理学的検索により *M. wolfii* による病変は、子宮・胎盤 [3, 6-10]、肺 [3-5, 8, 9]、肝臓 [7, 12, 13]、腎臓 [3] 及び大脳 [3, 8-10] で確認されている。本感染症は、オセアニア [5, 8, 9, 11, 13]、ヨーロッパ [4, 6, 7] 及び北米 [3, 10] の国々で発生があり、特にニュージーランドでは牛に流産を起こす真菌症の一つとして問題視されている [14]。アジアでは日本でのみその発生が確認され、牛の肝炎 [12]

や馬の角膜炎 [15] の報告がある。

今回、出生時より神経症状を呈し死亡した3日齢の黒毛和種子牛に真菌性壊死性小脳炎がみられた。この小脳のパラフィン切片より抽出したDNAを用いた分子生物学的解析により *M. wolfii* が病変形成に関与したと考えられたので、その概要を報告する。

## 材料及び方法

**発生状況：**2012年9月、繁殖39頭を含む黒毛和種91頭を飼養する北海道内の素牛生産及び肥育一貫農場において、初産の牛が胎齢271日で雄子牛1頭を分娩した。当該子牛は出生直後から起立不能、後弓反張及び意識混濁等の神経症状を呈した。補液、抗生物質及び抗炎症薬等の治療が行われたが生後3日で死亡した。本農場では過去に原因不明の早期流産が1件あった他は異常産の発生はなかった。また、当該子牛の母牛に、特に異常は認められなかった。この農場の繁殖牛は分娩2~3週間前まで昼夜放牧されていたが、草地の青草が不足し

† 連絡責任者：山本敦子 (北海道日高家畜保健衛生所)

〒056-0003 日高郡新ひだか町静内旭町2-88-5

☎0146-42-1333 FAX 0146-42-0542

E-mail: yamamoto.atsuko@pref.hokkaido.lg.jp



図1 小脳に出血と軟化がみられる

ていたため、畜主は別の草地から青草を刈り牛に与えていた。放牧地内には草地と森林があり、牛は自由に行き来できる状態であった。分娩牛舎は、昼間でも薄暗く、換気不十分な状態であった。

**病理学的検査：**剖検後、大脳、小脳、延髄及び五大臓器は、10%中性緩衝ホルマリン液で固定してパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を行い、過ヨウ素酸シッフ（PAS）反応及びグロコット染色を行った。

**免疫組織化学的検査：**小脳のパラフィン切片を用い、免疫組織化学的検査を実施した。抗 *Aspergillus fumigatus* 及び抗 *Rhizopus arrhizus* モノクローナル抗体（ダコ社、U.S.A.）[16] を用いて、市販キット（ヒストファイン SAB-PO (MULTI) キット, (株)ニチレイ, 東京）の手順に従って実施した。

**真菌学的検査：**小脳病変部パラフィン切片からプロテイナーゼ K（和光純薬工業(株), 大阪）及びフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール（ライフテクノロジーズジャパン(株), 東京）を用いて DNA を抽出した。プライマー ITS1 及び ITS4 を用いた PCR [17] により ITS1, 2 及び 5.8S リボゾーム領域を増幅し、得られた PCR 産物について、同一プライマーを用いたダイレクトシーケンスを行った。得られた塩基配列について National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を利用し BLAST による相同性検索を行った。

**細菌学的検査：**大脳、小脳、延髄及び5大臓器を5%羊血液加寒天培地及び DHL 寒天培地（栄研化学(株), 東京）を用いて5%炭酸ガス下及び好気下で37℃ 24時間培養した。

**ウイルス学的検査：**大脳、小脳、延髄、肝臓及び腎臓の各乳剤を用いて、牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）[18]、牛伝染性鼻気管炎ウイルス（IBRV）[19]、アカバネウイルス（AKV）[20] の遺伝子検査を行った。

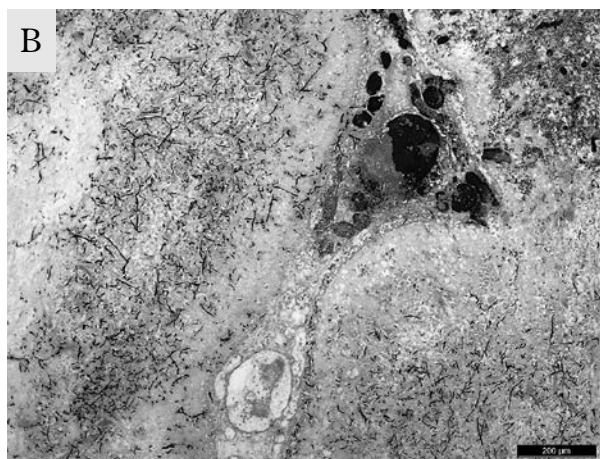
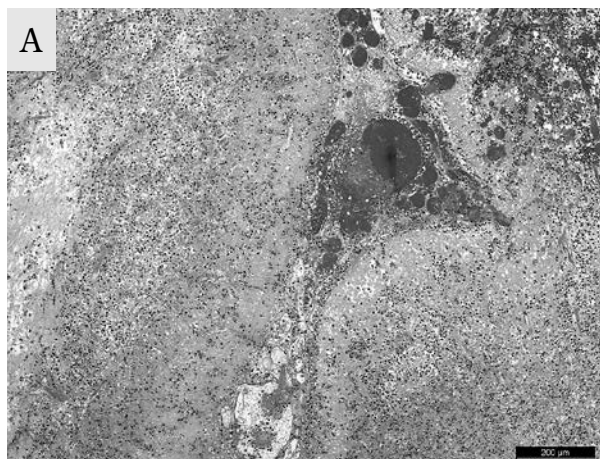


図2 小脳

A：実質に広範囲な壊死がみられ、髄膜に血栓形成がみられる。（HE 染色 Bar=200  $\mu$ m）

B：実質に真菌の増殖がみられる。（グロコット染色 Bar=200  $\mu$ m）

## 成 績

**病理解剖所見：**解剖時の体長は85cm、体重は23kgであった。小脳は小脳皮質から髄体の大部分に出血を伴う軟化がみられた（図1）。大脳は軽度の内水頭症を呈していた。肝臓と腎臓の漿膜下に直径3～10mm大の白色結節が散在し、脾臓に直径15mm大の赤色結節が1個存在していた。腸間膜リンパ節は腫大し、結腸粘膜に点状出血が散在していた。その他の臓器に著変は認められなかった。

**病理組織学的所見：**小脳では皮質から髄質にかけて壊死し、髄膜には血栓形成、線維素の析出及び好中球の浸潤が認められた（図2）。実質の壊死部を中心に真菌の増殖がみられた。PAS 反応及びグロコット染色により、真菌が血管壁から血管外に菌糸を伸長している像が明瞭に確認された（図3）。菌糸の太さは3～8  $\mu$ m と不均一で、まれに隔壁を有し直角から鈍角の分岐がみられた（図4）。肝臓、腎臓及び脾臓の結節部にも同様の真菌の

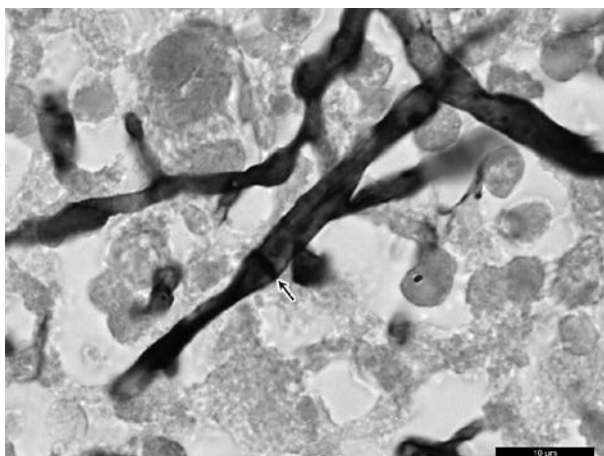


図3 菌糸の太さは不均一で、まれに隔壁(矢印)を有し、直角から鈍角の分枝を示す。(グロコット染色 Bar = 10 μm)

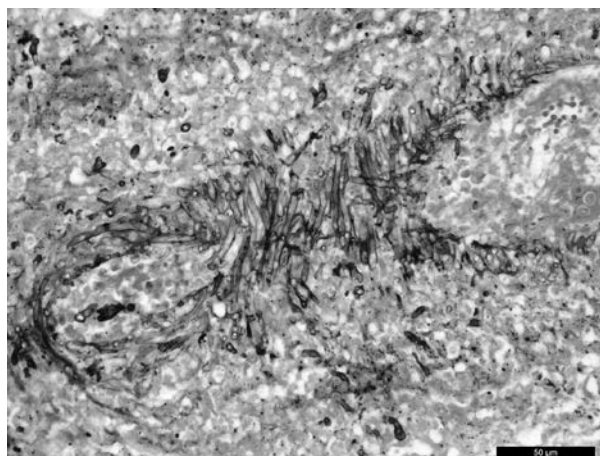


図4 血管壁から血管外に伸長する菌糸。(グロコット染色 Bar = 50 μm)

増殖がみられた。これらの真菌を中心に類上皮細胞と異物巨細胞の増殖を主体とした肉芽腫形成がみられた。その他の臓器に著変は認められなかった。

**免疫組織化学的所見：**抗 *A. fumigatus* 抗体及び抗 *R. arrhizus* 抗体を用いた免疫染色では陰性だった。

**真菌学的検査：**小脳病変部のパラフィン切片から抽出したDNAを用いたPCR及びダイレクトシーケンシングにより得られた600bpの塩基配列(Accession No. AB983712)をBLAST解析したところ、既知の *M. wolfii* 当該領域塩基配列と100%の相同性を示した。

**細菌学的検査：**細菌培養では、いずれの臓器からも有意菌は分離されなかった。

**ウイルス学的検査：**各臓器の乳剤からBVDV, IBRV及びAKVの特異遺伝子は検出されなかった。

## 考 察

後弓反張等の神経症状を呈し、生後3日目で死亡した黒毛和種子牛に真菌性壊死性小脳炎がみられた。病理学的検査及び小脳病変部のパラフィン切片より抽出したDNAを用いた分子生物学的解析の結果から本真菌を *M. wolfii* と同定した。神経症状が出生直後からみられたことから、真菌が分娩前に胎子に感染したと推察された。しかし、胎盤等の検査を実施していなかったため、感染経路は特定できなかった。

*M. wolfii* は、成牛の真菌性肺炎[3-5, 8, 9]や流産[3, 6-10]に関連があり、非常にまれに中枢神経系にも病変を形成するとの報告がある[3, 8-10]。これまで、神経症状を呈した成牛[3, 8]、新生子牛[9]及び流産胎子[10]の脳に病変が形成されているが、小脳の病変に関する記述は見当たらない。これら過去の症例[3, 8-10]と異なり、本症例では小脳病変を主徴とする点特徴的であった。偶発的に小脳で真菌が増殖し、大脳

等の中枢神経系に真菌が移入せず死亡した症例であったと推察された。また、これまで神経症状を呈する子牛[9]や流産胎子[10]の症例では、それらの母牛は分娩前後に肺炎や流産といった臨床症状が認められたが[9, 10]、本症例の母牛に異常はみられなかった。恐らく、妊娠末期に感染した母牛は臨床症状を示すことなく分娩に至ったと推察された。

母牛に流産が多発したオーストラリアの一酪農場では、給与されていたサイレージから *M. wolfii* が培養されている[9]。本症例においても、母牛に給与されていた飼料や放牧地の土壌が感染源である可能性はあったが、真菌の培養検査等を実施できなかったため、感染源の特定には至らなかった。

牛の真菌性流産の原因として *Aspergillus* 属や *Mucorales* 真菌が知られているため[21]、本症例ではこれらの真菌との鑑別が必要であった。病理組織学的検査により、病変部でみられた真菌は、幅が不均一でまれに隔壁を有する菌糸が、直角から鈍角の角度で分枝していた。隔壁を有する点では類似しているが、*Aspergillus* 属のように鋭角に分岐する均一な幅の菌糸[16]とは異なっていた。一方、*Mucorales* の菌糸とは直角から鈍角に分岐する点で類似しているが、病変部の菌糸は *Mucorales* ほど不整形な形態ではなかった[22]。なお、今回みられた *M. wolfii* の菌糸の形態や、血管から組織へ菌糸を伸長させる組織像は過去の報告[8]と非常に類似していた。また、*Zygomycetes* (接合菌綱) の真菌である *Lichtheimia* (旧: *Absidia*) *corymbifera*, *Rhizopus arrhizus* 及び *Rhizomucor pusillus* は抗 *R. arrhizus* 抗体を用いた免疫染色は陽性であるが、同じ綱に属する *M. wolfii* は陰性であることが明らかにされている[22]。本症例の免疫組織化学的検査の結果は過去の報告[22]と相違なかった。

既報告 [8] のとおり、本症例のように病理組織学的検査により真菌を確認後、生材料がなく真菌培養検査を行うことができない場合、抗真菌抗体を用いた免疫染色やパラフィン包埋材料を用いた分子生物学的解析による真菌種の同定が有用であった。

*M. wolfii* はニュージーランドを中心に、牛の真菌性肺炎や流産に関連があると報告されている [14]。今後、日本国内においても牛真菌症原因真菌の同定を実施する場合には、*M. wolfii* による真菌症についても考慮する必要があると考えられた。

### 引用文献

- [1] White MM, James TY, O'Donnell K, Cafaro MJ, Tanabe Y, Sugiyama J : Phylogeny of the Zygomycota based on nuclear ribosomal sequence data, *Mycologia*, 98, 872-884 (2006)
- [2] Wagner L, Stielow B, Hoffmann K, Petkovits T, Papp T, Vágvölgyi 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)
- [3] Davies JL, Ngeleka M, Wobeser GA : Systemic infection with *Mortierella wolfii* following abortion in a cow, *Can Vet J*, 51, 1391-1393 (2010)
- [4] Done SH, Sharp MW, Lupson GR : Isolation of *Mortierella wolfii* from bovine lung, *Vet Rec*, 134, 194 (1994)
- [5] Gabor LJ : Mycotic pneumonia in a dairy cow caused by *Mortierella wolfii*, *Aust Vet J*, 81, 409-410 (2003)
- [6] Johnson CT, Lupson GR, Lawrence KE : *Mortierella wolfii* abortion in British cows, *Vet Rec*, 127, 363 (1990)
- [7] MacDonald SM, Corbel MJ : *Mortierella wolfii* infection in cattle in Britain, *Vet Rec*, 109, 419-421 (1981)
- [8] Munday JS, Laven RA, Orbell GM, Pandey SK : Meningoencephalitis in an adult cow due to *Mortierella wolfii*, *J Vet Diagn Invest*, 18, 619-622 (2006)
- [9] Neilan MC, McCausland IP, Maslen M : Mycotic pneumonia, placentitis and neonatal encephalitis in dairy cattle caused by *Mortierella wolfii*, *Aust Vet J*, 59, 48-49 (1982)
- [10] Wohlgemuth K, Knudtson WU : Abortion associated with *Mortierella wolfii* in cattle, *J Am Vet Med Assoc*, 171, 437-439 (1977)
- [11] Munday JS, Wolfe AG, Lawrence KE, Pandey SK : Disseminated *Mortierella wolfii* infection in a neonatal calf, *N Z Vet J*, 58, 62-63 (2010)
- [12] Komoda M, Itoi Y, Ozai Y, Kimura Y, Koizumi S, Takatori K : An infection of cow with *Mortierella wolfii*, *Mycopathologia*, 101, 89-93 (1988)
- [13] 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)
- [14] Carter ME, Cordes DO, di Menna ME, Hunter R : Fungi isolated from bovine mycotic abortion and pneumonia with special reference to *Mortierella wolfii*, *Res Vet Sci*, 14, 201-206 (1973)
- [15] Wada S, Ode H, Hobo S, Niwa, H, Katayama Y, Takatori K : *Mortierella wolfii* keratomycosis in a horse, *Vet Ophthalmol*, 14, 267-270 (2011)
- [16] Yokota T, Shibahara T, Wada Y, Hiraki R, Ishikawa Y, Kadota K : *Aspergillus fumigatus* infection in an ostrich (*Struthio camelus*), *J Vet Med Sci*, 66, 201-204 (2004)
- [17] White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J : Amplication and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, PCR Protocols, Innis MA, et al eds, 315-322, Academic Press INC, London (1990)
- [18] Vilcek S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ : Pestivirus isolated from pigs, cattle and sheep can be allocated into at least three genogroups using polymerase chain reaction and restriction endonuclease analysis, *Arch Virol*, 136, 309-323 (1994)
- [19] Rocha MA, Barbosa EF, Guimarães SE, Dias Neto E, Gouveia AM : A high sensitivity-nested PCR assay for BHV-1 detection in semen of naturally infected bulls, *Vet Microbiol*, 63, 1-11 (1998)
- [20] Akashi H, Onuma S, Nagano H, Ohta M, Fukutomi T : Detection and differentiation of Aino and Akabane Simbu serogroup bunyaviruses by nested polymerase chain reaction, *Arch Virol*, 144, 2101-2109 (1999)
- [21] Jensen HE, Krogh HV, Schønheyder H : Bovine mycotic abortion--a comparative study of diagnostic methods, *Zentralbl Veterinarmed B*, 38, 33-40 (1991)
- [22] Jensen HE, Aalbaek B, Lind P, Krogh HV : Immunohistochemical diagnosis of systemic bovine zygomycosis by murine monoclonal antibodies, *Vet Pathol*, 33, 176-183 (1996)

### Necrotic Cerebellitis in a Neonatal Calf Caused by *Mortierella wolfii*

Atsuko YAMAMOTO<sup>1)†</sup>, Kiyoko NOBUMOTO<sup>2)</sup>, Ayumi KOBAYASHI<sup>3)</sup>, Yoshihiro WADA<sup>3)</sup>,  
Hanae INAGAKI<sup>3)</sup>, Yasuko HANAFUSA<sup>4)</sup> and Tomoyuki SHIBAHARA<sup>4)</sup>

- 1) *Hokkaido Hidaka Livestock Hygiene Service Center, 2-88-5 Shizunai-asahi-cho, Shinhidaka, Hidaka, 056-0003, Japan*
- 2) *Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center, 59-6 Kisen, Kawanishi, Obihiro, 089-1128, Japan*
- 3) *Hokkaido Ishikari Livestock Hygiene Service Center, 3 banchi Hitsujigaoka, Toyohiraku, Sapporo, 062-0045, Japan*
- 4) *National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

#### SUMMARY

A Japanese black neonatal calf showed ataxia, opisthotonus, and a decreased level of consciousness. The calf died on the third day after birth. In the necropsy, multiple white nodules were observed in the liver and kidneys, and a red nodule was observed in the spleen. Almost all areas of the cerebellum showed hemorrhagic and malacic changes. Histologically, hemorrhagic necrotic inflammation with numerous lesional fungal hyphae was observed in the cerebellum. In the kidneys, liver and spleen, granulomatous lesions containing fungal hyphae were also found. This fungus was identified as *Mortierella wolfii* based on a morphological and molecular biological analysis of a DNA sample obtained from the paraffin-embedded tissue of the cerebellar lesion. The present case was diagnosed as *M. wolfii* infection in a neonatal calf.

— Key words : *Mortierella wolfii*, necrotic cerebellitis, neonatal calf.

† Correspondence to : Atsuko YAMAMOTO (*Hokkaido Hidaka Livestock Hygiene Service Center*)

*2-88-5 Shizunai-asahi-cho, Shinhidaka, Hidaka, 056-0003, Japan*

*TEL 0146-42-1333 FAX 0146-42-0542 E-mail : yamamoto.atsuko@pref.hokkaido.lg.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 112 ~ 116 (2015)*