

## 原 著

口蹄疫を疑う通報を受けた農場での多様な病変を  
呈した牛丘疹性口炎の発生と拡大

永來沙夜子<sup>1)</sup> 中西 晶<sup>1)</sup> 安川幸子<sup>1)</sup> 森山美奈子<sup>1)</sup>  
小西美佐子<sup>2)</sup> 猪島康雄<sup>3), 4) †</sup>

- 1) 奈良県家畜保健衛生所 (〒 639-1123 大和郡山市筒井町 600-3)  
2) 国研農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 (〒 305-0856 つくば市観音台 3-1-5)  
3) 岐阜大学応用生物科学部 (〒 501-1193 岐阜市柳戸 1-1)  
4) 岐阜大学大学院連合獣医学研究科 (〒 501-1193 岐阜市柳戸 1-1)

(2015年12月9日受付・2016年3月30日受理)

## 要 約

4カ月齢の黒毛和種が流涎、上顎両側のびらん及び舌尖部と舌腹側部潰瘍を呈し、口蹄疫が疑われた。写真診断と疫学的状況から口蹄疫の可能性はきわめて低いとされたが、2週間の経過観察期間中に4～7カ月齢の同居牛10頭が発症し口腔内に発赤、紅斑、丘疹、びらん及び潰瘍といった多様な病変が認められた。そこでウイルス学的検査により病因解明を試みた。発症牛8頭の口腔内病変部スワブからPCRによりパラボックスウイルス遺伝子が検出された。PCR増幅産物の塩基配列はすべて同一であり、国内や海外の牛丘疹性口炎ウイルス分離株と遺伝学的に近縁であった。さらに血清中の抗牛丘疹性口炎ウイルス抗体が陽転した個体を認めた。以上の成績から本症例を多様な病変を呈した牛丘疹性口炎と診断した。——キーワード：牛丘疹性口炎、口蹄疫、丘疹、パラボックスウイルス、潰瘍。

-----日獣会誌 69, 323～328 (2016)

牛丘疹性口炎ウイルス (BPSV) は、ボックスウイルス科パラボックスウイルス (PPV) 属の2本鎖DNAウイルスである。PPV属にはそのほかに偽牛痘ウイルス、緬山羊の伝染性膿疱性皮膚炎の原因となるオーフウイルス及びニュージーランドのアカシカパラボックスウイルスが知られている [1]。PPV属ウイルスの感染個体では口腔粘膜、口周辺部の皮膚に丘疹、びらん、膿疱形成が認められるため口蹄疫の類似疾病として鑑別が必要である [2]。わが国では、牛丘疹性口炎は家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されており散発的に発生している [3, 4]。今回、黒毛和種牛1頭に流涎と口腔内の病変が認められたため口蹄疫を疑い初動対応を行った。当該牛は口蹄疫の可能性はきわめて低いとされたが、その後2週間の経過観察期間中に同居牛の口腔内に多様な病変が認められた。このことから原因解明のためウイルス学的検査を実施し、検出された遺伝子について解析を行ったので報告する。

## 材料及び方法

発生の概要：2015年1月、乳・肉用育成牛153頭、肉用 (黒毛和種・交雑種) 繁殖牛148頭を飼養する奈良県内の農場において、4カ月齢の黒毛和種1頭 (No. 1)

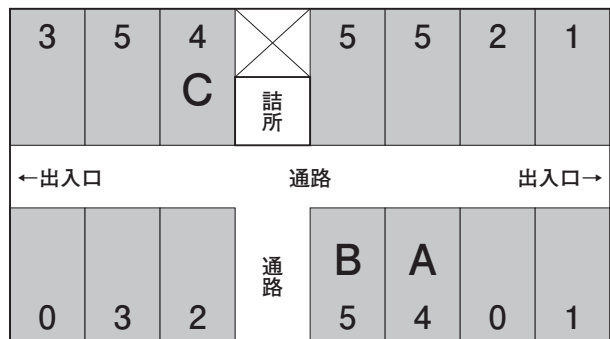


図1 各牛房の配置 (数字：飼養頭数) と発症がみられた牛房 (A, B, C)

† 連絡責任者：猪島康雄 (岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科 食品環境衛生学研究室)

〒 501-1193 岐阜市柳戸 1-1 ☎ 058-293-2863 FAX 058-293-2840 E-mail : inoshima@gifu-u.ac.jp

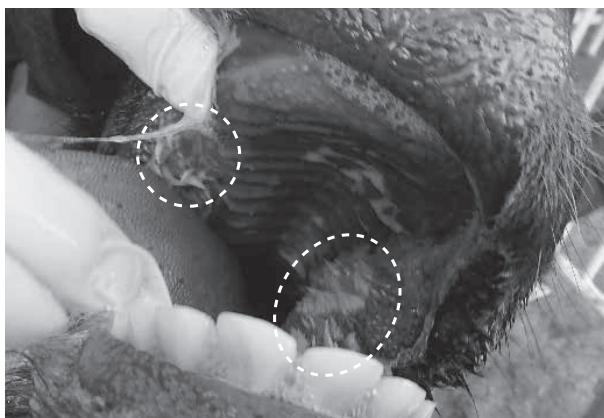


図2 初発牛の口腔内病変  
口蓋両側にびらんがみられる (点線)

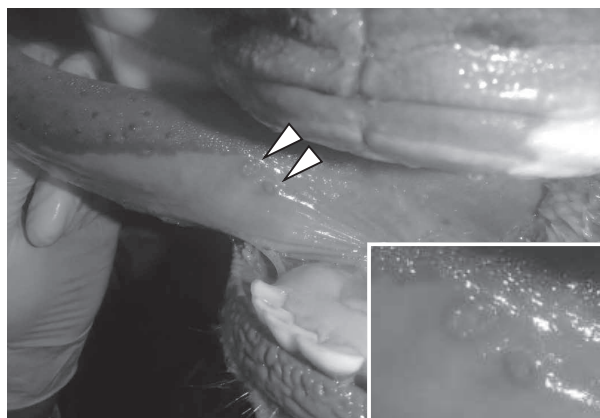


図4 続発牛における舌腹側部の丘疹 (矢頭)  
挿入：丘疹の拡大写真



図3 初発牛の口腔内病変  
舌腹側部に潰瘍がみられる (点線)

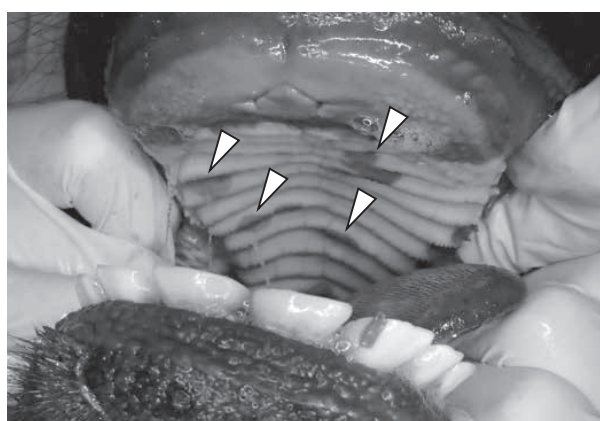


図5 続発牛における硬口蓋のびらん (矢頭)

に 39.8℃ の軽度の発熱，下痢，発咳及び流涎を認めた (図 1, 牛房 A)。上顎の両側口腔粘膜にはびらん (図 2) が，舌尖部及び舌腹側部には出血を伴う潰瘍 (図 3) が認められたが，口蹄疫の好発部位である上唇，下唇，頬前庭，鼻腔及び舌上部には口蹄疫に典型的な病変 (びらん，潰瘍あるいは水疱形成) [5] は認められなかった。上顎両側の病変部の一部は口蹄疫の水疱破裂後の病変と類似していたが，動物衛生研究所による写真診断及び発生初日に同居牛の発症がないという疫学的状況から，口蹄疫の可能性はきわめて低いとされた。しかし口蹄疫まん延の重大性に鑑み万全を期すため農林水産省の指示に基づき当該牛及び同居牛 39 頭に対し 2 週間の観察期間を設けた。翌日，隣接する牛房 (牛房 B) の 3 頭の口腔内に 2～3mm 程度の発赤が認められ，さらに初発翌日から 5 日後までに同一牛舎の 3 つの牛房 A, B, C において口腔内に病変を呈する牛が続発した (図 1)。症状の出現経過はほぼ同様であったが，病変は発赤，紅斑，丘疹，びらん及び潰瘍など多様であった (表 1, 図 4～6)。

ウイルス学的検査：発症牛 11 頭のうち 8 頭の口腔内



図6 続発牛における菌齦のびらん (点線)，鼻鏡及び下唇の丘疹 (矢頭)

病変部のスワブまたは剝離上皮乳剤上清から市販キット (Geno Plus Genomic DNA Extraction Miniprep System, Viogene, Taiwan) にて DNA を抽出し PCR を実施した (*TaKaRa Taq™ Hot Start Version*, タカラバイオ(株), 滋賀)。プライマーは Inoshima ら [6] の PPV エンベロープ遺伝子を特異的に検出する pan parapoxvi-

表1 発症の推移

牛房	No.	月齢	性別	経過日数						その他 (4~13日)	
				0	1	2	3	4	5		
A	1	4	雌	初発牛*						舌腹側/偽膜形成, 舌尖/癬痕	
	2	4	雄				下顎・舌腹側 /赤色丘疹			舌腹側/丘疹, 上顎・舌根/ びらん・癬痕, 上顎/発赤	
	3	5	雄					上顎/発 赤			
	4	5	雄							非発症	
	5	5	雄・ 去勢				上顎・舌根部 /びらん・発赤			病変ほぼ消失 (6日目) 後, 上顎・舌根/発赤・丘疹	
B	6	5	雌	下顎・舌腹 側・歯齦/ 発赤・丘疹・ びらん			上顎/びらん		上顎・下顎・舌腹側/ 発赤・びらん・癬痕		
	7	5	雄・ 去勢				上顎/結節		上顎・舌腹側/発赤, 上唇/白色 結節・癬痕・びらん, 上唇 (口腔 外)/丘疹, 上顎/癬痕・紅斑		
	8	4	雄・ 去勢	頬/発赤・ びらん				舌腹側・ 下顎/ 発赤	下顎・歯齦/びらん, 鼻鏡/丘疹, 上顎・下顎/癬痕, 舌根/発赤, 歯齦・下唇/丘疹		
	9	5	雌	下顎・右頬 /発赤・ 紅斑				上唇/痲疲		上下顎・舌腹側・上下唇/びらん, 両頬・下顎・舌腹側/発赤, 頬・上唇/丘疹, 下顎/紅斑	
	10	7	雌					下顎/ 発赤	上顎/発赤, 上唇/丘疹・びらん, 下顎/びらん		
C	11	7	雌							非発症	
	12	7	雄					舌腹側/ 発赤		下顎・頬/発赤, 舌腹側/ びらん・丘疹・癬痕・痲疲, 下顎/丘疹・潰瘍	
	13	6	雄	上顎・舌 腹側/び らん・発 赤・丘疹					上顎・鼻 鏡/びら ん・癬痕	舌腹側/発赤・丘疹, 上顎/癬痕・発赤, 下顎/発赤・潰瘍, 上唇/結節, 下唇・鼻鏡/丘疹, 舌根/発赤	

\*: 軽度の発熱 (39.8℃), 下痢, 発咳, 上顎両側口腔粘膜にびらん, 舌に潰瘍, 等 (図2, 3)

rus primer (PPP-1) 及び PPP-4 を使用した。条件は 95℃ 2分 で前熱変性を行った後, 熱変性 94℃ 30秒, アニール 55℃ 30秒, 伸長反応 72℃ 30秒を 40 サイクル実施し, さらに後伸長反応を 72℃ 7分とした (Thermal Cycler 2720, Applied Biosystems, U.S.A.)。PCR 増幅産物は 1.5% アガロースゲルにて電気泳動し, UV 照射によりバンドを確認後市販の核酸精製キット (QIAquick PCR Purification Kit, Qiagen, Germany) で精製し, 市販のシーケンス反応キット (BigDye Terminator v3.2 Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems, U.S.A.) を用いてサイクルシーケンシング反応を行った。市販キット (DyeEx 2.0 Spin Kit, Qiagen, Germany) を用いて精製後, オートシーケンサー (310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems, U.S.A.) により両鎖を解析し塩基配列を決定した。口蹄疫の類症鑑別疾病として牛ウイルス性下痢ウイルス (BVDV) の検査も実施した。口腔内病変部スワブと発症牛 11 頭の血清から市販キット (High Pure Viral RNA Kit, ロ

シュ・ダイアグノスティック株, 東京) にて RNA を抽出し, RT 反応 (ReverTra Ace, 東洋紡株, 大阪) 後 BVDV 5' 末端非翻訳領域 (UTR) を増幅する Vilcek ら [7] のプライマーを用いて PCR を実施した。条件は 98℃ 10秒 で前熱変性を行った後, 熱変性 94℃ 30秒, アニール 55℃ 30秒, 伸長反応 72℃ 1分を 35 サイクル実施し, 後伸長反応を 72℃ 7分とした (Thermal Cycler Veriti, Applied Biosystems, U.S.A.)。

**血清学的検査:** 発症牛 11 頭と非発症牛 2 頭の発生時 (急性期) 及び発生 1 カ月後 (回復期) のペア血清について, BPSV Chiba 株 [8] を抗原とした寒天ゲル内沈降試験を実施した。BVDV については, Nose [9] 及び KZ-91CP 株 [10] の中和試験を MDBK-SY 細胞 [11] を用いて実施した。

**病理組織学的検査:** 初発牛 (No. 1) の舌腹側部剥離上皮を 20% 緩衝ホルマリン液にて固定後, パラフィン包埋, ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を作製した。

多様な病変を呈した牛丘疹性口炎の発生と拡大

BN15	1	: TGGTGTGTTGGCGGCGTCGTCGCGGCCGGGATGGAGAAGAGCCGCTGGAGATGTCGATGCTCCACGCGCGAAGTCGTTTCAGCGTGC	100
Iwate2007	1	.....	100
Chiba	1	.....	100
V660	1	.....	100
BN15	101	: CACGGACAGCGGGTCCGCGTTCTTCCACTCCGTCACGATCACGCGGACGCGACGCTCGGTCGATAGCCGCGCGCAGCAACGCGTCCATGATCCGCGGC	200
Iwate2007	101	.....	200
Chiba	101	.....T.....G.....	200
V660	101	.....A.....G.....	200
BN15	201	: CAGTACTCCACGCGGTGCGGTGCGGGATCACGGGACAGGACAGCAGCAGGTCGATGCTGTTCTTCGCGGAGTCGATGCGGTGCAGCACCAGGT	300
Iwate2007	201	.....	300
Chiba	201	.....	300
V660	201	.....G.....	300
BN15	301	: CCTCGTCCAGCGTGCAGTAGAAGCCTAGGAACCTCTCGGGCGCGTCCGAGAAGAACACGCGCCGCCGCATGGTCCAGGTGGAAGTCGTCGCGTGGG	400
Iwate2007	301	.....	400
Chiba	301	.....C.....T.....	400
V660	301	.....C.....T.....	400
BN15	401	: CGTGATCATGGCGCAGCACAGCCGCGAGAAGGGACCTTGGGCTCCACGATCATGGAGTAGAAGGTGTTGTACCGTTTCATCAGTCCGTGGCCAGGTGC	500
Iwate2007	401	.....	500
Chiba	401	.....	500
V660	401	.....	500
BN15	501	: CGGTTGGTCGAGTACACCCAGGTTCTTGATGTTGGAGATGGAGCCGCCGTG	554
BPSV2007	501	.....	554
Chiba	501	.....	554
V660	501	.....G.....	554

図7 国内の牛丘疹性口炎ウイルス分離株 Iwate2007 (AB538385), Chiba (AB044798), 及び海外の V660 株 (AB044793) と BN15 株 (LC032028) のエンベロープ遺伝子塩基配列の比較

表2 遺伝子検査及び抗体検査\*

牛房	No.	牛丘疹性口炎ウイルス			牛ウイルス性下痢ウイルス								
		遺伝子検査	抗体検査		遺伝子検査				中和抗体価				
			プレ	ポスト	分離白血球		血清		Nose 株		KZ-91cp 株		
A	1	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	+	+	+	-	-	-	-	512	128	128	32	
	7		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	+	+	+	-	-	-	-	512	1024	2	2	
	9	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	10		-	+	-	-	-	-	<2	<2	<2	<2	
	11		-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
	12	+	-	+	-	-	-	-	2	2	<2	<2	
	13	+	+	+	-	-	-	-	4	<2	2	2	

\*: 空欄はすべて未実施

成績

**ウイルス学的検査成績:** PCRの結果, 8頭の検体すべてから PPV に特異的な遺伝子増幅産物 (594bp) が得られ, PCR産物から決定した塩基配列はすべて一致した. 国内の BPSV 分離株 Iwate2007 (Accession No. AB538385), Chiba (AB044798), 及び海外の分離株 V660 (AB044793) の塩基配列と比較したところ, おの

おの 100, 99.3 及び 98.9% の相同性を示した (図7). 推定アミノ酸配列は前述の国内分離株すべてと同一であった. 以上の成績より, 検出された BPSV を BN15 (Bovine Nara 2015) 株とした (LC032028). BVDV 遺伝子検出用 RT-PCR の結果はすべて陰性であった (表2).

**血清学的検査成績:** ペア血清を用いた寒天ゲル内沈降試験による抗 BPSV 抗体検査では, 発症牛 11 頭中 8 頭

及び非発症牛1頭で急性期及び回復期ともに陽性を示し、発症牛3頭及び非発症牛1頭は回復期に陽転した。中和試験によるBVDV抗体価はNose株・KZ-91CP株ともに有意な上昇は認められなかった(表2)。

**病理組織学的検査成績：**組織の壊死性変化が強く病態を特定できなかった。

## 考 察

本事例を多様な病変を呈した牛丘疹性口炎と診断した。BPSV抗体検査では発症牛11頭中8頭及び非発症牛1頭で急性期と回復期ともに陽性であった。牛丘疹性口炎は感染歴があっても再感染することや、ウイルスが持続感染することが報告されている[12-14]。本事例は4~7カ月齢という若齢での発症であり、移行抗体が消失する時期であるため、急性期の抗体はBPSV感染による抗体もしくは残存していた移行抗体と考えられるが、他の発症牛3頭と非発症牛1頭は回復期に陽転したことから、牛舎内で新規のBPSV感染が起きたものと考えられた。

感染牛の病変部より検出したBPSV遺伝子の塩基配列はすべて同一であり、感染拡大の経過と初発牛の潰瘍形成から、初発牛が本集団発生の感染源と推察された。初発牛は発症以前に下痢や発熱を呈し、抗生物質による治療を繰り返していたことから、移行抗体の消失時期と重なり免疫状態が低下したことが発症の要因として考えられた。発症牛の病変は発赤、紅斑、丘疹、びらん、潰瘍及び癬痕に至るものや、発赤、発疹のみで病変が消失し、その後新たに再発するものが観察され、牛丘疹性口炎は個体により多様な病変と経過を示すことが明らかとなった。こうした病変の多様性は、ウイルス暴露量や移行抗体消失・宿主の免疫力の差によって引き起こされたものと考えられた。多様な病変発現の原因解明のためには、個体の免疫状態の解析とともに、今回実施しなかったウイルス分離を行いウイルスの全ゲノム解析などが必要と思われる。またHuangら[15]は丘疹性口炎の牛1頭から遺伝的に異なる複数のBPSV株の混合感染を報告している。そのような場合、病原性や感染力に影響を及ぼし症状が多様になることも考えられるので、今後は重感染についても検討していく必要がある。

牛ウイルス性下痢病の検査にご助言いただいた農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門ウイルス・疫学研究領域の亀山健一郎博士に深謝する。本研究の一部は、科研費(No. 26660239)、北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター、及び(一財)旗影会からの助成を受けた。

## 引 用 文 献

[1] Mercer A, Fleming S, Robinson A, Nettleton P, Reid H : Molecular genetic analyses of parapoxviruses pathogenic for humans, *Arch Virol suppl*, 13, 25-34 (1997)

- [2] Brown CC, Baker DC, Barker IK : Foot-and-mouth disease, *Pathology of Domestic Animals*, vol. 2, Maxie MG ed, 5th ed, 135-137, Elsevier, Philadelphia (2007)
- [3] Yaegashi G, Sasaki I, Chiba S, Murakami K : Molecular analysis of parapoxvirus detected in eight calves in Japan, *J Vet Med Sci*, 75, 1399-1403 (2013)
- [4] 高橋真紀, 清宮幸男, 関 慶久, 本川正人, 熊谷芳浩, 芝原友幸, 木村久美子, 播谷 亮 : 牛丘疹性口炎に罹患した黒毛和種子牛の1例, *日獣会誌*, 63, 359-363 (2010)
- [5] 福所秋雄 : 口蹄疫, *獣医感染症カラーアトラス*, 見上 彪監修, 第2版, 435-437, 文永堂出版, 東京 (2006)
- [6] Inoshima Y, Morooka A, Sentsui H : Detection and diagnosis of parapoxvirus by the polymerase chain reaction, *J Virol Methods*, 84, 201-208 (2000)
- [7] Vilček S, Herring AJ, Herring JA, Nettleton PF, Lowings JP, Paton DJ : Pestiviruses 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)
- [8] Kuroda Y, Yoshida M, Shibahara T, Matsui T, Nakane T, Hara H, Inoshima Y, Sentsui H : An epidemic of parapoxvirus infection among cattle: Isolation and antibody survey, *J Vet Med Sci*, 61, 749-753 (1999)
- [9] Kodama K, Sasaki N, Fukuyama S, Izumida A, Ishii F : Studies on cytopathogenic bovine viral diarrhea virus recovery, identification, and properties of the isolated virus, *Bull Nippon Vet Zootech Coll*, 23, 51-60 (1974)
- [10] Nagai M, Sato M, Nagano H, Pang H, Kong X, Murakami T, Ozawa T, Akashi H : Nucleotide sequence homology to bovine viral diarrhea virus 2 (BVDV 2) in the 5' untranslated region of BVDVs from cattle with mucosal disease or persistent infection in Japan, *Vet Microbiol*, 60, 271-276 (1998)
- [11] 齋藤俊哉, 山口 修, 深井克彦 : 牛腎由来株化細胞を用いた牛ウイルス性下痢ウイルスのウイルス分離法及び抗体検査法, *日獣会誌*, 56, 717-721 (2003)
- [12] Brown CC, Baker DC, Barker IK : Parapoxviral infections, *Pathology of Domestic Animals*, vol. 2, Maxie MG ed, 5th ed, 162-163, Elsevier, Philadelphia (2007)
- [13] Iketani Y, Inoshima Y, Asano A, Murakami K, Shimizu S, Sentsui H : Persistent parapoxvirus infection in cattle, *Microbiol Immunol*, 46, 285-291 (2002)
- [14] Sentsui H, Murakami K, Inoshima Y, Shibahara T, Yokomizo Y : Isolation of parapoxvirus from a cow treated with interferon- $\gamma$ , *Vet Microbiol*, 70, 143-152 (1999)
- [15] Huang T, Tulman ER, Diel DG, Khatiwada S, Sims W, Edwards JF, Wen X, Kutish GF, Rock DL, Delhon G : Coinfection with multiple strains of bovine papular stomatitis virus, *Arch Virol*, 160, 1527-1532 (2015)

Occurrence and Spread of Bovine Papular Stomatitis with Different Types of Lesions  
Among Japanese Black Calves Suspected of Having Foot-And-Mouth Disease

Sayoko EIRAI<sup>1)</sup>, Aki NAKANISHI<sup>1)</sup>, Yukiko YASUKAWA<sup>1)</sup>, Minako MORIYAMA<sup>1)</sup>,  
Misako KONISHI<sup>2)</sup> and Yasuo INOSHIMA<sup>3),4)†</sup>

- 1) *Nara Prefectural Livestock Hygiene Service Center, 600-3 Tsutsui, Yamatokoriyama, 639-1123, Japan*
- 2) *National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*
- 3) *Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan*
- 4) *The United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, 1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan*

SUMMARY

Excessive salivation, erosion of the hard palate, and ulcers on the tongue were observed in a four-month-old Japanese black calf that was suspected of having foot-and-mouth disease (FMD). Although FMD was ruled out due to the clinical lesions and epidemiological status over the next two weeks, lesions were observed in ten other calves, ranging from four to seven months in age, at the same farm as well. The lesions included reddening, erythema, papules, erosions, and ulcers in the mouth. Using PCR, bovine papular stomatitis virus (BPSV) was detected in the oral swab samples from eight of the ten affected calves. The nucleotide sequences of the partial envelope gene were identical for all eight samples, and similar to those of the BPSV isolated in Japan. In addition, seroconversion against BPSV was observed in four of the ten affected calves. Based on these results, we diagnosed this as a case of BPSV infection with different types of lesions.

— Key words : bovine papular stomatitis, foot-and-mouth disease, papules, parapoxvirus, ulcer.

† Correspondence to : Yasuo INOSHIMA (*Laboratory of Food and Environmental Hygiene, Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University*)  
*1-1 Yanagido, Gifu, 501-1193, Japan*  
*TEL 058-293-2863 FAX 058-293-2840 E-mail : inoshima@gifu-u.ac.jp*

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 69, 323 ~ 328 (2016)