

学 位 論 文 要 旨

博士課程 ①・乙	第 号	氏 名	Mathurot Suwanruengsri
<p>[論文題名]</p> <p><i>Mycoplasma bovis</i> May Travel Along Eustachian Tube to Cause Meningitis in Japanese Black Cattle</p> <p>マイコプラズマ・ボビスは耳管から上向感染し、黒毛和種牛に髄膜炎を引き起こす。</p> <p>Journal of Comparative Pathology, accepted, 17 pages, 12-August-2021.</p>			
<p>[要 旨]</p> <p>[Introduction]</p> <p>Respiratory and oral routes have been reported for <i>Mycoplasma bovis</i> (<i>M. bovis</i>) infections of the upper and lower respiratory tracts. Otitis media in calves has been reported as being caused by <i>Haemophilus somnus</i>, <i>Pasteurella multocida</i>, <i>Streptococcus spp.</i>, <i>Actinomyces spp.</i>, the ear mite <i>Raillietia auris</i> and <i>M. bovis</i>. The main aetiology of calf otitis media is thought to be <i>M. bovis</i>, alone or with other bacteria. The routes of transmission identified by previous researchers were the extension of external ear infection, colonization of the oropharynx, extension via the eustachian tube, and haematogenous spread. The purpose of this study was to investigate the localization of <i>M. bovis</i> in the upper respiratory tract, around the pharynx, and in the brain tissue in order to better understand the transmission route of <i>M. bovis</i> otitis media and meningitis.</p> <p>[Materials and methods]</p> <p>Ten Japanese Black cattle in southern Kyushu, aged 2-17 months, which showed clinical symptoms of suspected <i>M. bovis</i> infection and had poor prognoses were necropsied. The tonsils, eustachian tubes, temporal bone (case no. 2), lungs, meninges and brains were collected and examined for <i>M. bovis</i> detection and histological examination. All tissue samples were screened for <i>M. bovis</i> using a loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method specific to <i>M. bovis</i>. Other potential bacterial infections of the eustachian tubes were excluded using conventional polymerase chain reaction. Immunohistochemistry (IHC) was carried out using a rabbit polyclonal <i>M. bovis</i> antibody as the primary antibody. The IHC result was semiquantitative graded as none (-), minimal (+), moderate (++), or severe changes (+++).</p> <p>[Results]</p>			

M. bovis was detected in several organs in all 10 cattle using LAMP detection. No other bacteria were detected in any of the eustachian tubes using PCR (*H. somnus*, *P. multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Trueperella pyogenes*). Two cattle developed unilateral or bilateral ear drooping. Caseous material filled the parietal meninges and extended to the cerebellum on the other side, covering the brain stem to the medulla oblongata. The right middle ear canal, located in the temporal bone, had an accumulation of yellowish to whitish exudate. There was no exudate accumulation in the external ear canal in any of the cases. Histology revealed two cases of meningoencephalitis and one of meningitis. Multiple nodules of caseous necrotic material were combined with degenerative neutrophils, neutrophils and macrophages. They were surrounded by macrophages and epithelioid cells, while mononuclear cells producing perivascular cuffs were found in the brain in one case. The temporal bone in case no. 2 also revealed caseonecrotic granulomatous inflammation. Necrotic materials, neutrophils, and macrophages admixed with bone lysis were found. Moreover, eight cases showed eustachitis on at least one side of the ear in varying grades (three of grade I, four of grade II, one of grade III). Tonsillitis, characterised by the accumulation of neutrophils and some macrophages with cell debris at the crypt and/or the lumen, was also found in nine cases. Suppurative bronchopneumonia was found in six cases. IHC revealed that *M. bovis* was labelled in most neutrophils and some macrophages, especially at the margin of meningeal caseonecrotic lesions in three cases. The eustachian tubes contained low numbers of *M. bovis*-labelled inflammatory cells, especially neutrophils in the lumen and epithelium. The epithelial cells of minor salivary glands surrounding the eustachian tube were labelled with *M. bovis* in seven cases. *M. bovis* was labelled in the exudative cells in the tonsil and epithelial cells of the tonsillar crypt.

[Discussion]

In this study, two cases of meningoencephalitis and one of meningitis out of 10 total cases were observed macroscopically and histopathologically in the brains of the cattle. *M. bovis* antigens were consistently detected using LAMP and IHC, which was confirmed by an *M. bovis* culture. Cranial nerves VII and VIII were normal in all cases, and no noticeable changes were observed in other organs. This suggests a direct transmission route of the *M. bovis* infection to the meninges by penetrating through the adjacent suppurative lesion. Otitis media was found in 8 of the 10 cases in this study, which did not extend from the external ear. *M. bovis* antigens were consistently present on the site. Therefore, it can be concluded that otitis media in this study was not affected by the extension of external ear infection or haematogenous spread. However,

they might be affected by the oropharynx and extended via the eustachian tubes.

[はじめに]

上気道および下気道におけるマイコプラズマ・ボビス (*M. bovis*) 感染は、経気道または経口感染するとされている。子牛の中耳炎の主な原因は、*M. bovis* の単独または他の細菌等 (*Haemophilus somnus*, *Pasteurella multocida*, *Streptococcus* spp., *Actinomyces* spp., 耳ダニの *Raillietia auris*) との混合感染であり、感染経路として、外耳からの感染、中咽頭に定着後に耳管を介した感染および血行性の感染が報告されている。本研究では、*M. bovis* 中耳炎ならびに髄膜炎の主要な感染経路を明らかにすることを目的として、上部気道、咽頭周囲および脳における *M. bovis* の局在を詳細に調査した。

[材料と方法]

南九州の異なる農場で飼養され、*M. bovis* 感染が疑われる臨床症状を示し、予後不良で廃用となった黒毛和種牛 10 頭 (2~17 ヶ月齢) の剖検を実施し、扁桃腺、耳管、側頭骨 (症例 no. 2)、肺、髄膜、脳を収集し、*M. bovis* の検出と組織学的検査を行った。全ての組織サンプルについて、*M. bovis* 遺伝子検出を LAMP 法で行った。また、耳管については、中耳炎または呼吸器病起因細菌 (*H. somnus*, *P. multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Trueperella pyogenes*) の遺伝子検出を PCR 法で行った。さらに、一次抗体として抗 *M. bovis* ウサギポリクローナル抗体を使用し、免疫組織化学染色 (IHC) を実施した。IHC の結果は半定量的に、著変なし (-)、最小 (+)、中程度 (++)、または重度の変化 (+++) として評価した。

[結果]

M. bovis 遺伝子は、LAMP 法により 10 頭すべての複数組織から検出されたが、耳管の PCR では *M. bovis* 以外の中耳炎または呼吸器病起因細菌遺伝子は検出されなかった。2 頭の牛が片側または両側の耳の下垂を示した。それらは、乾酪性物質が頭頂髄膜を満たし、反対側の小脳、延髄に至る脳幹を覆っていた。さらに、側頭骨にある右中耳道には、黄色から白色の滲出液が蓄積していた。いずれも、外耳道に滲出液の漏出はみられなかった。組織学的検査により、2 例の髄膜脳炎、1 例の髄膜炎が明らかになった。複数の結節性の乾酪壊死物質内には、変性好中球、好中球およびマクロファージが混在し、マクロファージと類上皮細胞に囲まれていた。脳に、単球の囲管性細胞浸潤が認められるケースもあった。また、症例 no. 2 の側頭骨には、壊死物質、好中球および骨溶解と混合したマクロファージからなる壊死性肉芽腫性炎がみられた。さらに、8 例では、少なくとも片側の耳にさまざまなグレード (+ : 3 例, ++ : 4 例, +++ : 1 例) の耳管炎がみられた。扁桃の陰窩および/または内腔に細胞破片を伴う好中球およびマクロファージの蓄積を特徴とする扁桃炎が 9 例で、化膿性気管支肺炎が 6 例で認め

られた。IHC では、特に 3 例の髄膜の壊死性病変の辺縁部において、*M. bovis* 抗原が主に好中球と一部のマクロファージ内に認められることを明らかにした。また、耳管では、少数の *M. bovis* 抗原を含む炎症細胞が、内腔と上皮に存在していた。この 7 例では、耳管周辺の小唾液腺上皮細胞内にも *M. bovis* 抗原が認められた。*M. bovis* 抗原はまた、扁桃陰窩の上皮細胞内および浸潤細胞内にも認められた。

[考察]

この研究では、10 例中 2 例で髄膜脳炎、1 例で髄膜炎が肉眼的および病理組織学的に観察された。*M. bovis* は、LAMP 法および IHC により検出された。第 VII および VIII 脳神経はすべての症例で正常であり、病変部以外の組織に著変はなかった。このことから、隣接する化膿性病変から髄膜への *M. bovis* の直接感染が示唆された。中耳炎は、10 例中 8 例でみられたが、外耳から感染が拡大したものはなかった。*M. bovis* 抗原は一貫して扁桃と耳管に存在していた。したがって、この研究における中耳炎は、外耳または血行性に感染したのではなく、中咽頭から耳管を介して感染したと結論付けた。