

## 2 牛のヨーネ病患畜における病理組織学的検討

県中央家畜保健衛生所

矢島佳世、湯澤裕史、高橋孝志

はじめに

牛のヨーネ病（以下、ヨーネ病）は、全国的に発生が認められている家畜伝染病である。その診断は、エライザ法による抗体検査（以下、エライザ検査）ヨーネ菌分離培養による細菌学的検査及びヨーニン検査によって行われ、補助的診断としてリアルタイム PCR 検査（以下、rPCR）が実施されている。

本県においてもヨーネ病の発生が多数認められており（図 1）ヨーネ病発生農家に対しては、国が制定した牛のヨーネ病防疫対策要領<sup>1)</sup>に準じた栃木県牛ヨーネ病防疫対策要領に基づき、清浄性確認検査に基づく清浄化対策を実施している。本病の診断は、家畜伝染病予防法（以下、法）第 5 条に基づく定期検査では、判定までに多くの時間を要さないエライザ検査を主とするが、清浄性確認検査においては、エライザ検査に加えて、補助的診断である rPCR を積極的に実施している<sup>2,3)</sup>。しかし、農場によってはエライザ検査とそのほかの検査結果が合致しないことが報告されており<sup>2)</sup>、全国的にも、抗体検査で摘発されたヨーネ病患畜（以下、患畜）において腸管の肉眼病変を認めず、腸管内容物のヨーネ菌分離検査陰性であり病理組織学的にもヨーネ菌が確認されないという報告があることから<sup>4-8)</sup>、清浄化を達成するためには各種検査結果の相関関係を明らかにしていく必要がある。

そこで、診断の精度を高めることを目的とし、病理組織学的検査と血清学的検査、細菌

学的検査、遺伝子学的検査との関係について検討した。

また、過去に、エライザ検査のみ陽性の患畜が発生した農場において、エライザ検査陰性の牛が、乳房炎発症後に抗体陽転した報告<sup>10)</sup>や、乳房炎罹患牛の乳汁から非定形抗酸菌が分離され、同一農場におけるエライザ抗体陽性の患畜の血清を、分離した抗酸菌で吸収処理するとエライザ値が低下するとの報告<sup>11)</sup>もあり、乳房炎とエライザ抗体価の上昇に何らかの関係があることが示唆されている<sup>5)</sup>。そこで、検査法の検討に加え、エライザ検査陽性でヨーネ病の病変がない患畜の乳房について、病理組織学的検査を中心に精査し、乳房炎とエライザ検査の非特異反応との関連について検討した。

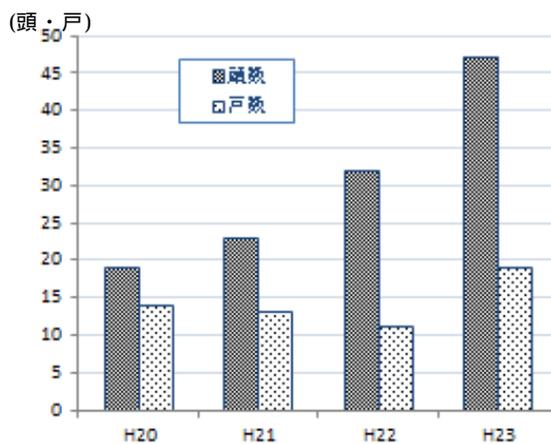


図 1 栃木県におけるヨーネ病発生頭数及び戸数

## 材料及び方法

### 1 調査対象

平成 22 年 12 月から平成 24 年 10 月までに、現行の公定法であるエライザ検査により患畜と診断した牛 26 頭を検査に供した。

### 2 病理組織学的検査

#### (1) 材料

ヨーネ病検査マニュアル<sup>12)</sup>を基に、腸管(十二指腸、空腸上部、空腸下部、回盲部から 1m 上、回盲部から 50cm 上、回盲部から 30cm 上、回盲部から 10cm 上、盲腸、結腸、直腸)、リンパ節(空腸部腸間膜リンパ節、回腸部腸間膜リンパ節、盲腸リンパ節、乳房上リンパ節、浅頸リンパ節、腸骨下リンパ節)を採材した。

そのほか、病変の分布を確認するため、主要臓器(肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺)及び生殖器(卵巣、子宮)を採材した。

さらに、エライザ検査の非特異反応と乳房炎の関係を調べるため、乳房を採材した。

#### (2) 方法

剖検後、採取した臓器・組織を 20% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、定法によりパラフィン包埋後、切片を作成した。これらの切片はヘマトキシリン・エオジン(HE)染色及びチール・ネルゼン染色を施した。また、病変に応じてグラム染色、過ヨウ素酸シッフ染色(以下、PAS 反応)及びワーチン・スターリー染色を実施した。

### 3 細菌学的検査

剖検前に採取した糞便を用いて、ヨーネ病検査マニュアル<sup>12)</sup>に基づき、マイコバクチン加ハロルド培地によるヨーネ菌分離を実施した。

なお、病理組織学的に病変が認められた部位については菌分離を実施した。

### 4 遺伝子学的検査

細菌学的検査と同一の糞便を用いて、ヨーネ病検査マニュアル<sup>12)</sup>に基づき、rPCR を実施した。

## 結果

### 1 組織病変、rPCR、菌分離との関連

検査に供した 26 頭のうち、病理組織学的検査によりヨーネ病に特徴的な肉芽腫病変あるいは抗酸菌が認められた患畜は 5 頭であった。これらはすべて rPCR で陽性であり、菌分離成績についても、結果が出ているものはすべて陽性となった。それ以外の 21 頭の患畜についてはヨーネ病特有の病変は認められず、rPCR 及び菌分離はすべて陰性であった。統計学的にも、病変の有無とこれら検査結果の関連が強いことが確認された(表 1)。

表 1 組織病変、rPCR 検査、菌分離成績

ヨーネ病病変	頭数	rPCR 検査陽性	菌分離陽性	
			数	検体数
あり	5	5	2	(3検体は実施中)
なし	21	0	0	(2検体は実施中)

オッズ比: 473(p<0.001) 195(p<0.001)

### 2 ヨーネ病病変を認めた患畜

ヨーネ病の病変は、回腸及び腸管膜リンパ節を中心に認められ、空腸から結腸まで及び患畜も認められた(表 2)。肉眼所見では腸粘膜の肥厚が認められ、組織所見では、主に絨毛先端部の粘膜固有層にラングハンス型の多核巨細胞の浸潤を主体とする肉芽腫が認められた。同部位のチール・ネルゼン染色では、肉芽腫病変部内の類上皮細胞及び多核巨細胞

内に抗酸菌が認められた（図2）。

また、腸間膜リンパ節でも、濾胞辺縁に類上皮細胞による肉芽腫が認められ、病変部にはチール・ネルゼン染色で抗酸菌が確認された（図3）。これらの病変は、腸管の死後変化が強く病変を確認できなかった症例を含めた5頭すべてに、病変又は抗酸菌が認められた（表2）。

なお、主要臓器、生殖器、体表リンパ節において、肉眼的には子宮蓄膿症、第二胃の双口吸虫寄生が、病理組織学的には壊死性肺炎が認められたが、いずれにおいてもヨーネ病による肉芽腫性病変は認められず、抗酸菌も確認されなかった。

表2 ヨーネ病病変の分布

No.	十二指腸	空腸上部	空腸下部	回腸	回腸末端	盲腸	結腸	直腸	空腸Ly	回腸Ly	盲腸Ly
1	-	-	++	++++	+	NT	++	-	++	+	+
2	-	++	++	++	++	-	-	-	+++	++	++
3	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-
4	-	-	-	-	NT	-	-	-	-	+	-
5	NT	NT	NT	NT	死後変化	NT	NT	NT	NT	NT	+

(けん部切開で回腸末端のみ検材)

+:病変あり 背景 ■:抗酸菌検出

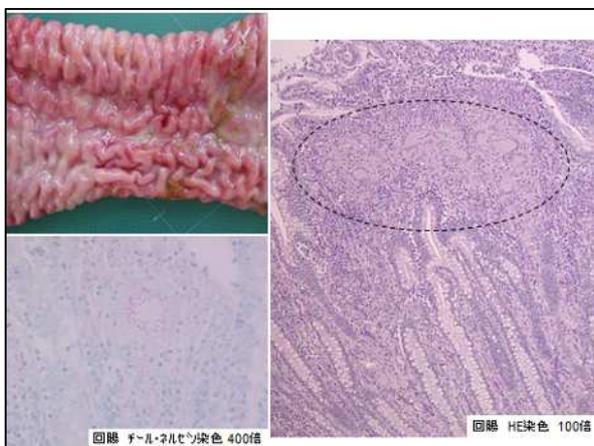


図2 腸管のヨーネ病病変

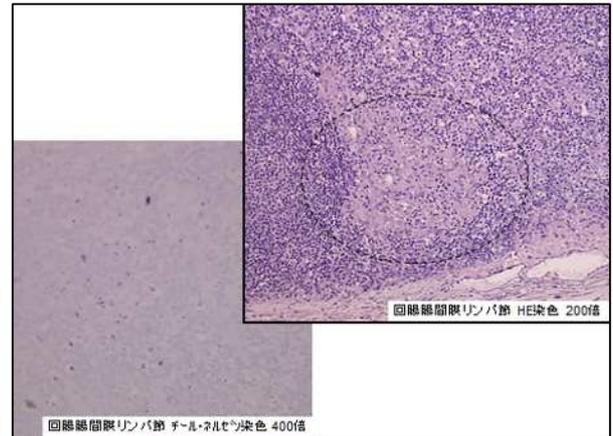


図3 腸管膜リンパ節のヨーネ病病変

### 3 ヨーネ病病変を認めなかった患畜

#### (1) 腸管の所見

ヨーネ病の病変を認めなかった患畜21頭については、肉眼的に腸粘膜の肥厚を認めず、病理組織学的検査では、ヨーネ病病変の好発部位である腸管において、9頭にコクシジウムや異物による肉芽腫が認められた。これらの病変部についてチール・ネルゼン染色を実施したところ、抗酸菌は確認されなかった。

#### (2) 乳房の精査

ヨーネ病の病変を認めなかった患畜21頭については、乳房炎と抗酸菌の関連について検討をするため、乳房の病理組織学的検査を実施し、病変を認めた症例については細菌分離検査を行った。

その結果、21頭中16頭で乳房炎を認め、主に化膿性及び肉芽腫性病変が確認された。また、細菌学的にも同部位から数種類の細菌が分離された（表3）。なお、これら乳房炎を認めた16頭において、病理組織標本のチール・ネルゼン染色を行ったが、抗酸菌は検出されなかった。

表3 ヨーネ病病変を認めない患畜(乳房)

頭数	病変	原因因子	チール・ネルセン染色
16/21	化膿性 肉芽腫性 非化膿性	<i>Prototheca</i> spp. <i>Arcanobacterium</i> <i>Pyogenes</i> <i>Corynebacterium</i> 2種	抗酸菌は 検出されず

### 考察

ヨーネ病は、長い潜伏期間を特徴とし<sup>13)</sup>、不定期に排菌と休眠を繰り返す感染症である<sup>14)</sup>。感染宿主の免疫状態や、排菌状況は病気の進行とともに変化するため<sup>15)</sup>、一回の検査及び一つの検査で判断することは困難と言われている。

本調査において、エライザ検査で患畜と診断された26頭のうち、腸管やリンパ節などの好発部位において、ヨーネ病に特徴的な病変が認められた患畜5頭は、全てrPCR及び菌分離は陽性であった。一方、ヨーネ病の病変が認められなかった患畜21頭は、全てrPCR及び菌分離は陰性であった。これらのことから、エライザ検査には少なからず非特異反応があることが確認され、病理組織学的検査と細菌学的検査及び遺伝子学的検査の結果に高い相関が認められた。

また、ヨーネ病の特性から、エライザ検査で摘発される患畜は感染の後期に当たり、その時期には多量に排菌している場合が多いと考えられ<sup>8)</sup>、エライザ検査のみによる摘発では、間欠的な排菌牛や抗体上昇前の排菌牛が農場に残るため、ヨーネ病の汚染が続くことが報告されている<sup>16)</sup>。

一方、本調査において、エライザ検査が陽性の症例においても排菌が確認されない症例

が多く認められた。このような状況を補い、早期に診断するには、菌分離やrPCR等の細菌学的検査を取り入れることが推奨されている<sup>13,15,17)</sup>。本調査の結果からも、排菌牛を含めた感染牛の摘発には、抗体検査、細菌学的検査、遺伝子学的検査を併用することが重要であり、さらに病理組織学的検査により病変形成及びヨーネ菌を確認することで、診断精度が向上することが再確認された。

さらに、ヨーネ病の病変が認められた患畜は、全頭の腸間膜リンパ節及び盲腸リンパ節に病変、又は抗酸菌が確認された。腸間膜リンパ節は、経口的に摂取されたヨーネ菌が初期病巣を形成して潜伏するため<sup>15)</sup>、ヨーネ病の診断においては重要な部位と考えられている。本調査において、死後変化が強く腸管の病変確認が困難な患畜の場合でも、盲腸リンパ節でヨーネ病の病変形成が認められており、ヨーネ病の病理組織学的検査材料として腸間膜リンパ節及び盲腸リンパ節の採材は有効であることが確認された。

ヨーネ病の病変を認めなかった患畜において、病理組織学的に乳房炎罹患乳房の検査を行ったが、抗酸菌は確認されず、エライザ検査の陽性反応との関連は不明であった。しかし、環境から分離された抗酸菌が乳房炎乳から分離された抗酸菌と一致し、その分離菌によりエライザ検査抗体が陽転した可能性が示唆されたとの報告があることから<sup>6)</sup>、さらに調査を進めるためには、環境の細菌学的検査も合わせた試みが必要であると考えられる。

近年、エライザ検査の非特異反応が疑われる報告が相次いでいることから<sup>4-8)</sup>、ヨーネ病検査法について見直され、平成25年度から法施行規則が改正される予定である。それにより、補助的診断に用いていたrPCRが確定診

断に取り入れられ、rPCRのみで患畜を診断することも可能となる。しかし、rPCRの性質として、死菌への反応や、体内に定着せずに排泄された菌にも反応し摘発する可能性も考えられる<sup>2)</sup>。そのため、診断の際はrPCRのみではなく各種検査を組み合わせて検査を実施し、結果について総合的に診断していく必要がある。

今後も病理組織学的検査を継続して実施し、頭数を重ねることで病態の解明に繋げ、ヨーネ病防疫の一助にしたい。

#### 参考文献

- 1) 牛のヨーネ病防疫対策要領(平成18年11月1日付け18消安第8586号)。
- 2) 久保卓司ら .2009. 第51回栃木県畜産関係業績発表会集録 . 17-22
- 3) 蓼沼亜矢子ら .2011. 第53回栃木県畜産関係業績発表会集録 .1-5
- 4) 樋口良平ら .1996. 臨床獣医 . 14:41-43
- 5) 本間裕一ら .2008. 第50回新潟県家畜保健衛生業績発表会集録 . 52-54
- 6) 矢部静ら .2009. 第51回新潟県家畜保健衛生業績発表会集録 . 52-55
- 7) 濱谷景祐ら .2009. 第51回栃木県畜産関係業績発表会集録 . 15-16
- 8) 田邊ひとみら .2011. 第53回茨城県家畜保健衛生業績発表会集録 . 32-36
- 9) 岡田綾子ら .2007. 第49回鳥取県畜産技術業績発表会集録 .
- 10) 濱崎尚樹ら .2012. 臨床獣医 . 30:5.36-39
- 11) 矢部静ら .2010. 第52回新潟県家畜保健衛生業績発表会集録 .
- 12) ヨーネ病検査マニュアル .2011年1月31日版 .
- 13) 森康行 .2011. 家畜診療 . 58:3.139-145
- 14) 横溝祐一 .1990. 山口獣医学雑誌 . 17: 1-26
- 15) 森康行 .2008. 家畜衛生フォーラム2008要旨集 . 99-101
- 16) Ferrouillet C, et al.2007. Abstract Proc,9th.int.Colloq.Paratuberculosis .264
- 17) 鹿島悠幹ら .2011. 第53回茨城県家畜保健衛生業績発表会集録 . 76-79