

2 牛のヨーネ病患者及び胎子における病理組織学的検索

県中央家畜保健衛生所

矢島佳世、塩生光男

はじめに

家畜伝染病予防法による牛のヨーネ病(以下、ヨーネ病)の検査は、主に糞便からのヨーネ菌分離及びELISA法による血清中の抗体検査により診断され、糞便中のヨーネ菌特異遺伝子(以下、遺伝子)を検出するリアルタイムPCR法(以下、rPCR)が補助診断として用いられてきた。しかし、平成25年度から、各検査の特徴を踏まえ、迅速な診断及び排菌している牛を確実に摘発するため、rPCRが公定法として改正され、ヨーネ病患者(以下、患者)を摘発することが可能となった。しかし、通過菌を検出する可能性があるrPCRの特徴を考慮すると、単一の検査で判断をせず、rPCRと病理組織学的検査をはじめとする各種検査の関係性についてさらなる調査を実施し、rPCRの信頼度を確認する必要がある^{1、2、3)}。またヨーネ病は、感染宿主の免疫状態や排菌量が病気の進行とともに変化するため一回のrPCRのみで感染の進行状況を把握することは困難であることから³⁾、清浄性確認検査による複数回のrPCRの検査結果と詳細な病理組織学的検査を比較検討することで、感染動態の解明につながると考えられる。そこで、rPCRで患者となった牛について病理組織学的検査等を行い、それらの検査結果について比較検証した。さらに、ヨーネ病の子牛への感染経路は、出生後の経口感染が主体とされており、その原因としては、ヨーネ病発症牛の大量のヨーネ菌を含んだ糞便、あるいはそれらに汚染され

た餌、水⁴⁾及び病態が進んだヨーネ病発症牛の乳汁⁵⁾等が挙げられる。これ以外に、海外を中心に胎子感染が報告^{6、7、8、9)}されており、近年、国内でも報告^{10、11)}があることから、本県のヨーネ病の胎子感染の実態調査として、本年度患者となった牛の胎子について検査を実施したので、併せて報告する。

材料及び方法

1 rPCRによる患者の検査及び比較検証

(1) 調査対象

平成25年4～11月までに、rPCRによりヨーネ病患者(以下、患者)と診断した牛6頭を検査に供した。

(2) 病理組織学的検査

剖検後、ヨーネ病検査マニュアル¹²⁾(以下、マニュアル)を基に採取した臓器・組織を20%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常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(以下、HE)染色及びチール・ネルゼン(以下、ZN)染色を施した。

(3) 遺伝子学的検査及び細菌学的検査

剖検前に採取した糞便を用いて、マニュアルに基づき、rPCRによる遺伝子量の測定、糞便の直接塗抹標本の鏡顕及び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。

(4) 比較検証

ZN染色で肉芽腫内に確認できた抗酸菌の程度により、抗酸菌が認められなかった場合は(一)、抗酸菌が1～10個程度と少量の場合

は (+)、10 個以上と多量の場合は (++)、数えることが困難なほど非常に多量の場合は (+++) の四段階に分類し (図 1)、rPCR による糞便中の遺伝子量と比較した。

また、ヨーネ菌の分離成績と各種検査成績についても比較するとともに、清浄性確認検査時の糞便中の遺伝子量の推移について検証した。

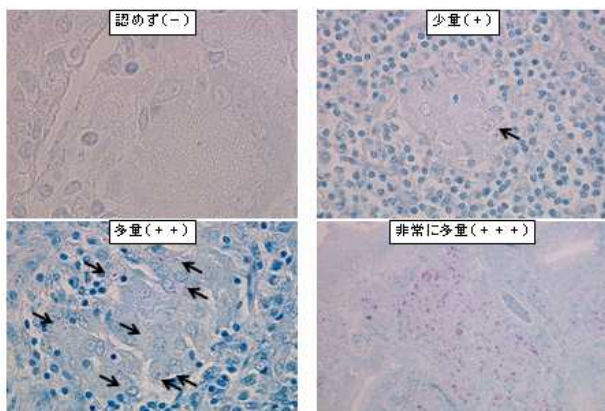


図 1 組織中の抗酸菌の程度

2 ヨーネ病患者の胎子感染の調査

(1) 検査対象

平成 25 年 4~11 月までの患者のうち、妊娠していた牛 4 頭の胎子 5 頭を検査に供した (図 2)。



図 2 検査対象 (胎子感染の調査)

(2) 病理組織学的検査

主要臓器、胎盤及び臍帯を材料とし、前述の検査と同様に、常法により切片を作成し、HE 染色及び ZN 染色を実施した。

(3) 遺伝子学的検査

主要臓器、胎盤及び臍帯 (胎子 1~4 はパラフィンブロック、胎子 5 は生臓器) を用い、マニュアルに基づき、ヨーネスピッド ((株) ファスマック) を用いて遺伝子を抽出し、rPCR による遺伝子の検出を実施した。

結果

1 rPCR による患者の検査及び比較検証

(1) 病理組織学的検査

6 頭全ての腸管及び腸間膜リンパ節において、ヨーネ病に特徴的な類上皮細胞による肉芽腫形成及び抗酸菌が認められ、病変の分布及び抗酸菌の程度により、+~+++ の 3 段階に分類された。

+ と判定した 4 頭 (症例 1~4) の病変は、回腸及び腸間膜リンパ節に認められ、一部では空腸下部にも確認されたが、いずれも小腸の下部に限局していた。腸管では、絨毛先端部にラングハンス型の多核巨細胞を主体とする肉芽腫が散発的に認められた。なお、肉芽腫内には、少量の抗酸菌が確認された (図 3)。

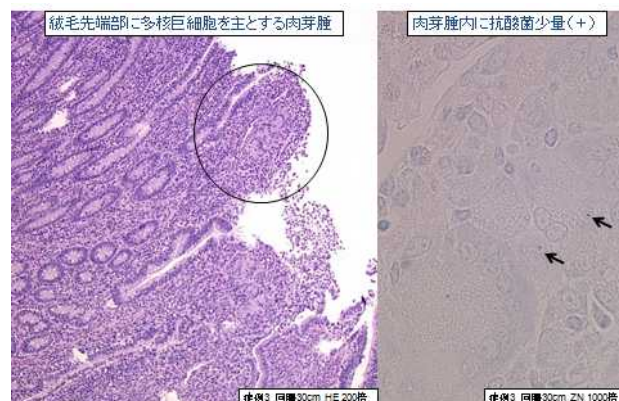


図 3 病理組織学的検査 (症例 1~4)

また、++と判定した1頭（症例5）の病変分布は、回腸及び腸間膜リンパ節に局限して認められ、肉芽腫は、主に陰窩付近に類上皮細胞を主体とし、肉芽腫内に多量の抗酸菌が認められた（図4）。

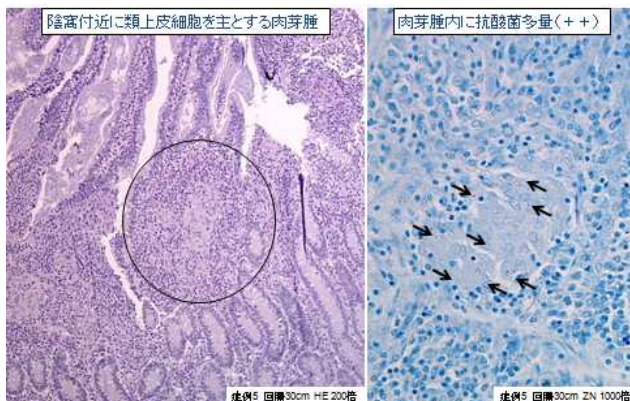


図4 病理組織学的検査（症例5）

+++と判定した1頭（症例6）の病変は、空腸上部から直腸まで広範囲に分布し、粘膜固有層から粘膜下組織及び筋層にかけて、類上皮細胞が重度に浸潤した肉芽腫が認められた。なお、肉芽腫内には、抗酸菌が非常に多量に確認された。

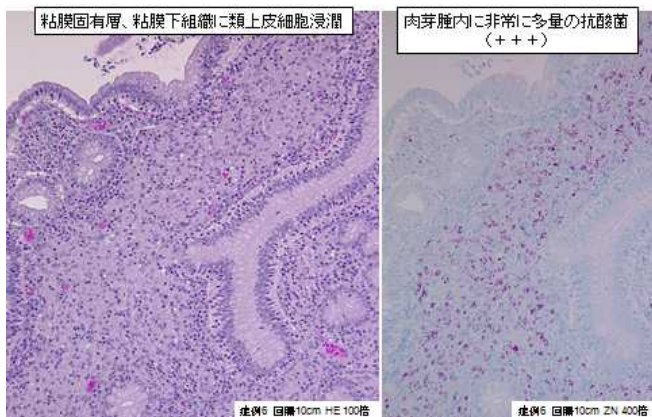


図5 病理組織学的検査（症例6）

（2）rPCR

遺伝子量は、+と判定した症例1～4のいずれも $10^{-3} \sim 10^{-2}$ pg/well と低値を示し、++と判

定した症例5の遺伝子量も同様に 10^{-2} pg/well と低値であったが、+++と判定した症例6の遺伝子量は、102pg/well と高値を示した（表1）。

（3）細菌学的検査

菌分離では、症例1～3の3頭については陽性であり、4～6については培養を継続中であった（表1）。なお、症例6は、糞便の直接塗抹標本の鏡顕において、抗酸菌が認められた。

表1 検査結果

	病変の分布	肉芽腫の主な細胞	チール・ネルセン染色	剖検時遺伝子量 (pg/well)	菌分離
症例1	回腸、腸間膜リンパ節	多核巨細胞	+ (リンパのみ)	10^{-3}	+
症例2	回腸、腸間膜リンパ節	多核巨細胞	+ (腸管のみ)	10^{-2}	+
症例3	回腸、空腸下部、腸間膜リンパ節	多核巨細胞	+	10^{-2}	+
症例4	回腸、空腸下部、腸間膜リンパ節	多核巨細胞	+	10^{-2}	検査中
症例5	回腸、腸間膜リンパ節	類上皮細胞	++	10^{-2}	検査中
症例6	空腸上部～直腸、腸間膜リンパ節	類上皮細胞	+++	10^2	検査中

（4）患者の糞便中遺伝子量の推移

表2に、症例1～5の遺伝子量の推移を示した。症例2、4及び5においては、患者として摘発される以前に、現行の rPCR 診断基準である 10^{-3} pg/well 以上の遺伝子量が検出されていたが、症例2を除く4頭においては、現行の rPCR 診断基準未満の遺伝子量が検出される時があった。

また、症例3及び4では、数回の検査のうち、遺伝子量の減少及び未検出の結果の時が認められたが、いずれの症例も、遺伝子量が増加傾向にあることが確認された。

表 2 患畜の糞便中遺伝子量の推移

	清浄性確認検査実施回数				剖検時
	1	2	3	4	
症例1	—	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴		10 ⁻³
症例2	—	10 ⁻³	10 ⁻³		10 ⁻²
症例3	10 ⁻⁴	—	—		10 ⁻²
症例4	10 ⁻³	—	—	10 ⁻⁴	10 ⁻²
症例5	10 ⁻⁴	10 ⁻²			10 ⁻²

—:検出されず

2 ヨーネ病患者の胎子感染の調査

すべての胎子において、病理組織学的検査では、主要臓器、胎盤及び臍帯には病変及び抗酸菌は認められなかった。遺伝子学的検査でも、胎子 1~4 のパラフィン切片及び胎子 5 の生臓器のすべてで遺伝子は検出されなかった (表 3)。

表 3 検査結果 (胎子感染)

	病理組織学的検査	遺伝子学的検査		母牛の糞便の遺伝子量 (pg/well)
	主要臓器 胎盤、臍帯	遺伝子量 (パラフィン切片)	遺伝子量 (生臓器)	
胎子1	—	—	NT	10 ⁻²
胎子2	—	—	NT	10 ⁻²
胎子3	—	—	NT	10 ⁻²
胎子4	—	—	NT	10 ⁻²
胎子5	—	NT	—	10 ²

—:検出されず

考察

本調査において、rPCR で確定した患畜は、全頭に病理組織学的検査で病変が認められ、結果が出ている患畜においてヨーネ菌が分離された。これより、糞便に診断基準以上の遺伝子量があれば、特徴的な病変を形成し、菌分離も陽性となることが再確認され、信頼性が

証明された。

rPCR と病変の分布及び程度をみると、遺伝子量が低値であった症例 1~5 の病変は、限局し軽~中等度であり、遺伝子量が高値であった症例 6 の病変は、広範かつ重度であったことから、病変の程度が強いと遺伝子量が多くなる傾向があると思われた。

肉芽腫の主な構成細胞及び抗酸菌の程度について、症例 1~4 は多核巨細胞が主であり抗酸菌の量も軽度であったことから、細胞性免疫主導の結核型病変 (Tuberculoid 型病変)^{13、14)} であり、ヨーネ菌に対して抵抗性を持ち、排菌が抑制され、発症に至る前の時期である可能性が考えられた。また、症例 5 及び 6 では肉芽腫の構成細胞が類上皮細胞主体であることから、液性免疫主導でヨーネ菌感染に感受性があるらい型病変 (Lepromatous 型)^{13、14)} と考えられ、症例 1~4 よりも活発に排菌をしている可能性が考えられた。

さらに、清浄性確認検査時の糞便中の遺伝子量の推移では、患畜決定時までに遺伝子量が増加傾向にある一方で、未検出の時も確認された。

このような病変の分布、程度、肉芽腫の構成細胞及び抗酸菌の程度と、遺伝子量の推移から、症例 1~5 はいずれも発症前の間欠排菌、あるいは発症初期の低濃度の排菌時期であると推察された。なお、症例 6 は、糞便の直接塗抹標本による抗酸菌の確認、病理組織学的にも重度な病変及び高い遺伝子量を認めており、ヨーネ病を発症していた。

今回の調査では、糞便の遺伝子量と病理組織学的検査結果を比較したが、6 頭と少数のため、今後も継続してデータを蓄積したい。

また、今回検査を実施した患畜のうち、4 頭は過去に糞便の rPCR で診断基準未満の遺伝

子量が検出され、後に患畜となったことから、自主淘汰を行うことが農場の清浄化につながると考える。しかし、低濃度の遺伝子量の牛のため通過菌の可能性を考慮し、農場の環境の検査や、複数回の rPCR を行う等の対応が必要であると考ええる。

胎子感染についての今回の調査は、すべての症例において病理組織学的に病変は認められず、既報^{10、11)}と同様の結果となった。

遺伝子学的検査では、パラフィン切片からの遺伝子を抽出した胎子及び生臓器を用いた胎子のどちらにおいても、遺伝子は検出されず、今回の胎子感染の調査において胎子感染は認められなかった。

矢島ら¹¹⁾は、低い遺伝子量が検出された母牛の胎子であっても、rPCR で 10^{-7} ~ 10^{-5} pg/well の遺伝子量が検出され、低排菌量の牛でも容易に胎子感染が成立する危険性を示唆している。しかし、今回の調査では、糞便遺伝子量が多い患畜の胎子の生臓器においても遺伝子は検出されなかったことから、今後は症例数を増やし、胎子感染について検討を重ね、農場清浄化の一助とし、ヨーネ病防疫に役立てたい。

なお、パラフィン切片を用いた遺伝子の検出は、過去の患畜の胎子についても調査が可能であり、胎子感染の解明に有用であると考えられるため、今後は実施法の確立及び検証が必要と考える。

参考文献

- 1) 久保卓司ら. 2009. 平成 21 年度栃木県畜産関係業績発表会集録:17-22
- 2) 矢島佳世ら. 2012. 第 54 回栃木県畜産関係業績発表会集録.
- 3) 森康行. 2008. 家畜衛生フォーラム 2008 要

旨集:99-101

- 4) 森康行. 2011. 家畜診療. 58:3, 139-145
- 5) 横溝祐一. 1990. 山口獣医学雑誌. 17: 1-26
- 6) Dyle T.M. 1958. Veterinary Records. 70, 238
- 7) Sstiz S.E. *et al.* 1989. Journal of American Veterinary Medicine Associate. 194:1423-1426
- 8) Sweeny R.W. *et al.* 1992. American Journal of Veterinary Research. 53(4):477-480
- 9) Whittington R. J. *et al.* 2009. Veterinary Journal. 179:60-69
- 10) 工藤剛ら. 2006. 平成 18 年度岩手県家畜衛生年報:83-86
- 11) 矢島りさら. 2013. 平成 25 年度全国家畜衛生業績発表会抄録.
- 12) ヨーネ病検査マニュアル. 2013 年 3 月 29 日版.
- 13) Pathology of Domestic Animals. 4th edition. 2:247-251
- 14) 甲斐貴憲ら. 2009. 家畜衛生週報. 3072:318-320