

牛ヨーネ病の発生状況と防疫

誌名	農林水産技術研究ジャーナル
ISSN	03879240
著者	横溝, 祐一
巻/号	13巻12号
掲載ページ	p. 18-24
発行年月	1990年12月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



牛ヨーネ病の発生状況と防疫

横溝 祐一

牛ヨーネ病の1970年～79年における法令殺頭数は50頭にすぎないが、1980年以降の10年間における法令殺頭数は857頭に達した。本病のこのような著しい増加傾向は、輸入牛に限定していた本病が国産の乳牛に広く浸潤したこと、そして和牛にも集団発生がみられるようになったことに起因している。本病は抗酸菌の一種であるヨーネ菌による慢性の腸管感染症であり、感染から発病には数年を要し、死亡率は低い、発病牛の数倍を占める不顕性感染牛により著しい生産性の損耗をこうむる。このような状況に対応するため、家畜衛生行政部局ならびに生産者から、牛ヨーネ病に対する清浄化対策の確立が強く要請されてきた。本病に対する最優先防疫手段は病牛の早期摘発と淘汰であるが、細菌学的診断には長期間を要すること、また旧来の血清学的反応では非特異反応の回避が困難なことから、信頼性の高い迅速診断技術の開発が緊要研究課題となった。最近、著者は、ヨーネ病診断用 ELISA を開発し、血清学的診断精度を著しく向上させることに成功した。また、英国でヨーネ菌同定用の DNA プローブの分離に成功したことから、これらの新診断技術の採用によるヨーネ病の防疫推進が期待されている。

はじめに

ヨーネ病(Johne's disease: パラ結核: paratuberculosis)はヨーネ菌(*Mycobacterium paratuberculosis*; パラ結核菌)による牛及び緬山羊の慢性腸管感染症である。本病は家畜法定伝染病に指定されており、病牛は法的に殺処分される。発病まで3～6年もの長期間の潜伏期を示す代表的慢性病である^{3), 18)}。ヨーネ菌は腸管組織のマクロファージの細胞内に寄生して大増殖し、激的な下痢と削瘦を招く(写真1)。



写真1 ヨーネ病発病牛

激的な反復下痢と極度の削瘦を特徴とする

病牛の糞便中には 10^{6-9} コ/gもの莫大な菌数のヨーネ菌が排出されるため、同居する仔牛は容易に経口感染する。発病率は数%にすぎない

Yuichi Yokomizo: Current topics of the diagnosis of bovine paratuberculosis

が、発病後に急激に栄養状態が悪化して、数カ月以内に大部分は衰弱死の運命をたどる。本病は、発病前においても、乳量の生産性において7~16%、また肉牛の増体率においても13%もの減少をきたすことが明らかにされており、酪農・肉牛産業において、重要損耗疾病の一つとなっている^{3, 8, 11, 18)}。本病に対してはワクチンによる予防法や抗生物質による治療法がほとんど期待できず、病牛の摘発と淘汰が唯一の防疫方法となっている。ところが、感染牛摘発のための診断技術については特異性や感度のうえで信頼性が低く、本病の清浄化の大きな障害となってきた。本稿では、ヨーネ病の世界的な発生状況を紹介した後、新しく開発された細菌学的診断技術のDNAプローブ法ならびに血清学的診断技術のELISA法の有用性を述べる。

ヨーネ病の発生状況

本邦でのヨーネ病初発例が、1930年に英国から輸入された種畜に記録されて以来、約50年間は米国、カナダからの輸入牛に年間数頭の発生をみるにとどまっていた。ところが、1980年に北海道南部の褐毛和種群、そして1982年の東北

北部での黒毛和種群での大発生をみるにおよび、ヨーネ病の国内での深刻な浸潤状況が明らかとなった¹⁸⁾(図1)。この褐毛和種群でのヨーネ病法令殺頭数は現在まで80頭を超え、牛の移動にともなって、道央にも2次発生をひきおこした。黒毛和種の最初の集団発生として摘発された某県では1,000頭以上の一貫経営牧場で、3頭の重症例の摘発を契機に、2年間の間に100頭を超える感染牛が摘発された。その後、黒毛和種での発生は、この群でのヨーネ病摘発前に、同群から導入した都下の離島農場においても6年後に2次発生が認められ、また群規模の発生が北海道、関東、近畿でも認められた。乳牛においても、かつての輸入牛の偶発疾病のイメージは払拭され、輸入牛との接触経歴のない多くの国産牛に発生が報告されている。北海道央での乳牛症例35頭は、疫学調査から汚染源を3頭の米国からの輸入牛に特定することができ、過去20年間の間に、ほんの1にぎりの輸入牛とともに侵入したヨーネ病が不顕性感染牛の移動とともに広範囲に浸潤したものと考えられる²⁰⁾。

米国では1943年に33州で、そして1971年には46州で本病の発生がみられ、最近ではほぼ全土にわたって症例が報告されている。最近、米国家畜疾病研究所により32州の76カ所の食肉処理場から7,540頭分の腸管(腸リンを含む)が収集され、培養法で1.6%が陽性(乳牛で2.95%、肉牛で0.6%)の陽性率が得られた⁹⁾。本病の発生分布は米国本土全州にわたっており、特に有数の酪農地帯として知られるウイスコンシン州での1982年度での1,000頭の廃用屠畜を対照とした大規模な培養調査では10.8%の高い陽性率を記録している⁸⁾。ついで、1988年度のウイスコンシン州の調査では38,000乳牛群のうち2,400群がヨーネ病汚染群とされているという。また、東部のニューイングランド地方での110頭の屠畜牛での調査では18%³⁾、カリフォルニア州での3,140頭の糞便培養検査では3%陽性の成績が報告されている¹⁾。オーストラリアにお

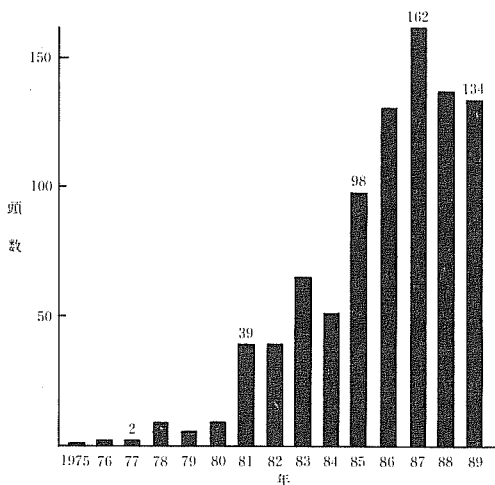


図1. 牛ヨーネ病の法令殺頭数の推移
1981年度から増加傾向を示す

いては1988年度のビクトリア州での調査成績によれば、乳牛群 9,810 のうち 1,282 群 (13%), 肉牛群 21,478 のうち 84 群 (0.4%) が過去 5 年以内にヨーネ病の発生をみている。オーストラリアでは本邦同様、ヨーネ病を家畜法定伝染病に指定しており、1987年度においては発病牛及び無症状感染個体を含めて 936 頭が摘発され、補償殺処分をうけた。1989年度の本邦における輸入牛頭数は 28,742 頭 (屠場直行は 18%) にも達したが、大部分は米国及びオーストラリア産によって占められており、輸入牛に対するヨーネ病検査体制を強化するために、動物検疫所では糞便培養法を採用した。

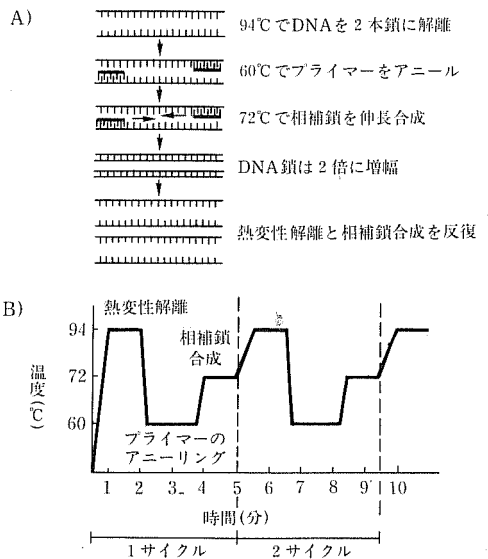
ヨーネ菌の特異遺伝子のクローニング

ヨーネ菌は非定型抗酸菌 (結核菌群以外の抗酸菌) のⅢ群に属し、鳥型結核菌とは生物化学的性状が極めて似ている^{3, 19)}。また、両菌種の染色体 DNA の塩基配列は極めて高い相同性をもつので¹⁾、ヨーネ菌にのみ特異な DNA 塩基配列を得ることは極めて困難と考えられていた⁵⁾。ところが、McFadden らは、クローン病患者由来のヨーネ菌株の遺伝子ライブラリーからヨーネ菌の DNA と強く、鳥型結核菌 DNA とは弱くしかハイブリダイズしないクローン pMB 22 を得、ついで、鳥型結核菌とはハイブリダイズせずヨーネ菌 DNA とのみ反応するサブクローンを選択し、ついに pMB 22/S12 というヨーネ菌特異サブクローンの作製に成功した⁷⁾。これは、各種の抗酸菌の DNA とのサザンハイブリダイゼーションでヨーネ菌に対する厳密な特異性が確認され、後に紹介する糞便からの DNA プローブによるヨーネ菌検出技術の開発の基礎となった。pMB22 クローンは *Streptomyces coelicolor* の IS110 (挿入配列) の塩基配列に配列の極似する IS900 (1451 塩基対から構成) を含んでいる。IS900 は染色体 DNA のなかに 10 コピー以上が含有され、鳥型菌には存在しない。この IS900 に含まれる S-12 サブクローンの塩

基配列のうち AGGTTGTGCCACAACCACCTCCGTA がプローブとして用いられる。なお、糞便からのヨーネ菌 DNA のコピー増幅に使用される PCR プライマーは IS900/150C (CCGCTAATTGAGATGCGATTGG) と IS900/921 (AATCAACTCCAGCAGCGCGCGGCCTCG) であり Taq DNA ポリメラーゼ存在下で 229 塩基対を伸長することができる¹³⁾。

PCRによるDNA増殖と DNA プローブによるヨーネ菌の迅速検出

DNA のポリメラーゼチェーンリアクション (PCR) による増幅は、臨床材料からの検出目標病原微生物の高感度検出を可能にした。PCR は標的 DNA 塩基配列のみを増幅するために、それに固有のオリゴヌクレオチド (プライマー) をハイブリダイズさせ、次に Taq ポリメラーゼによって、添加した 4 種の塩基をつぎつぎと標的 DNA に沿って伸長させていくものである。



注) A) : DNA の解離とプライマーによる相補鎖合成
B) : 温度処理プログラム

図2 ポリメラーゼ・チェーン・リアクションによる DNA の高速増幅

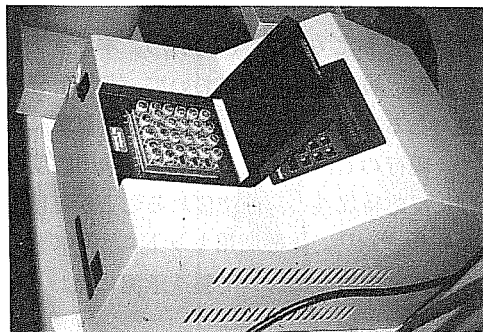


写真2 サーマルサイクラー (Perkin Elmer Cetus)

ヨーネ菌のDNAの連鎖増幅反応の加熱サイクル処理に使用

これには、94°C、1分間の加熱によりヨーネ菌の2本鎖のDNAを1本鎖に開裂させ、ついで、60°C、2分間においてプライマーをアニールさせ、最後に72°C、1分間で相補鎖の合成を行う(図2)。Taqはこの高温条件にも耐えるため、このサイクルをくりかえすことが可能であり、サーマルサイクラー(写真2)での数時間の反復加熱処理(DNAの加熱解離→プライマーのアニーリング→相補鎖の合成)で、100~1000万倍にDNAコピーを増幅する(臨床検体中の1コの菌のDNA量を100~1000万倍とする)ことが可能である。これにより、以後のDNAプローブによるザザンドットプロットでのDNA検出はアイソトープを必要とするほどの感度がなくてもよく、酵素・基質反応で容易に検出できる。

IDEXX社から提供されたヨーネ菌検出用DNAプローブキットの試供品によるヨーネ菌DNAの増幅とDNAプローブによる検出は以下のようである。

(1) 糞便材料の前処理(集菌とDNA採取)

- 1) 糞便1gを溶解液15mlに分散させて30秒間攪拌し、1晩静置し、ヨーネ菌を含む上清部分を採取
- 2) 上清0.5mlをイオン交換カラムに流し、付着したヨーネ菌を0.2NのNaOHで溶出させる。流出画分を3,000rpm,40分間遠心し、集菌し、沈澱に0.2NのNaOHの250

μlを添加し、ネジフタ付コニカルチューブに移す。

- 3) ヒートブロックにて120°C,10分間加熱し、細胞壁を溶解させ、DNAを遊出させる。

(2) DNAの増幅

- 1) 1サンプルあたりPCR用試薬1(4種類の塩基とプライマー)52μlと試薬2(Taq)44μlを増幅用チューブにいれ、ミネラルオイルを2滴添加した後、試験材料の1μlを底部に注入する。
- 2) DNA増幅装置にチューブをセットし、PCRプログラムをスタートさせる。約3時間で、35回の増幅操作を反復する。

(3) DNAの検出

- 1) プロット用ナイロン膜上に試験材料の3μlを滴下した後、0.4N NaOHを浸した濾紙上に5分間静置し、2本鎖DNAを1本鎖に開裂させる。
- 2) プロット膜をブロッキング液をいれたプラスチック袋にいれ、55°C,30分間処理した後、コンジュゲート溶液(酵素標識DNAプローブ)を添加し、同条件で処理する。
- 3) 洗浄液で3回洗浄した後、基質溶液を添加し、37°C,2時間感作した後、1%氷酢酸で洗浄し、濾紙上で乾燥する。陽性検体は紫色スポットとして検出される。

ヨーネ病診断用ELISAの開発

家畜伝染病予防法に定められたヨーネ病の基準診断法はCFテストとヨーニンテストである。ヨーネ病では、感染後数カ月で細胞性免疫応答の表現型であるヨーニン反応が陽性となるが、病勢進行とともに陰転し、替って、液性免疫応答のCF反応が陽性となる^{3,20)}。

このため、ヨーニンテストでの病牛摘発感度は極めて低く、CFテストが免疫学的診断法として汎用されてきた。CFテストは発病牛の確定診断法として有用であるが、偽陽性反応が牛群によっては高率に出現するため、無症状感染

牛の摘発精度は低い³⁾。そこで、著者は、信頼性の高い血清学的診断法の開発を主要研究課題としてきた。技術改良のポイントを、検査システムの迅速化、判定の自動化と大量処理機能におくため、反応システムとしてオートリーダーの利用できる ELISA を選択し、抗体検出感度の向上と特異性の向上に力点を置いた。ELISA 抗原は糖脂質抗原、蛋白抗原ならびに全菌体抗原を比較したところ、蛋白抗原が抗体検出感度のうえで、最も優れることが示された。また、牛血清中の免疫グロブリンクラスなかで、IgG1 の選択検出系が反応特異性のうえで、他のクラス検出系よりも優れることが証明された^{14, 15)}。この反応系においても、類縁菌感染牛では偽陽性反応が出現したので、血清を種々の抗酸菌で吸収処理したところ、*Mycobacterium phlei* (フレイ菌) の加熱死菌体での吸収により、交差抗体が除去されることが判明した¹⁵⁾。牛血清のフレイ菌吸収による反応特異性の向上は米国、オーストラリアにおいても追試され、ヨーネ病の血清診断への応用における有用性が確認された^{2, 8, 10, 12)}。また、ELISA の固相への非特異吸着抗体はカオリンでの吸収で回避できることが示された¹⁷⁾。以上の基礎試験成績にもとづき、抗原、吸収剤、指示陰性血清、指示陽性血清の凍結乾燥品、ならびに抗牛 IgG1 家兔血清、抗家兔 IgG 標識山羊抗体の凍結品からな

るヨーネ病診断用 ELISA キットを試作し、製品化試験をおこなった(写真3)。本キットは、保存試験、規格検査試験において、品質管理が可能であることが示され、また、野外試験において、現行の CF テストよりも抗体検出感度ならびに反応特異性の両面で優れることが証明された^{6, 11, 16, 17)}。本診断用キットについては、現在、薬事審議会において製造承認に係わる審査が行われている。

ヨーネ病の防疫対応

ヨーネ病汚染群において、下痢や消瘦等の臨床症状を示すものは数%にすぎず、大部分は無症状感染牛であるが、発症の数カ月～1年以上前から糞便中にヨーネ菌を排菌するため、これらの不顕性感染牛の摘発が防疫の成否を決定する。そこで、まず、著者は1986年にヨーネ菌の分離培養に必須のマイコバクチン(ヨーネ菌は代謝に必須の鉄キレーターのマイコバクチン産生性を欠く)を製品化し、ヨーネ病の細菌学的検査技術を全国の病鑑施設に普及させた。これによって、ヨーネ病の防疫は飛躍的に前進したが、判定に2～4カ月を必要とすること、雑菌汚染により判定がしばしば障害されることなどの問題点が指摘されてきた。これに対処するため、上述の ELISA テストを汚染群に対し適用し、病牛の早期摘発をはかってきた。図3は和牛汚染群における、清浄化計画経過中における ELISA 抗体陽性率の推移であり、陽性牛の淘汰後、何回かの陽性率のピークが認められる。これは、ヨーネ菌がマクロファージ内に寄生し、極めて緩慢な病勢経過をたどり、ELISA 抗体を含む液性免疫応答は感染後1年以内ではほとんど陽転しないため、一部を偽陰性として見逃がすことになるからである。したがって、清浄化のためには、糞便培養と ELISA テストを1歳以上の個体を対象に、年3～4回にわたり実施する必要がある。DNAプローブ法による排菌陽性牛の摘発は、ELISA 抗体陰性の糞便培養陽

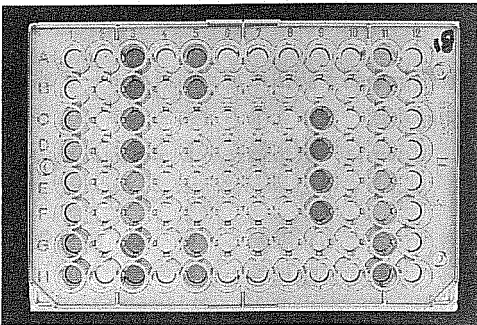


写真3 ヨーネ病抗体陽性牛検出用のELISAテスト

抗原・抗体反応を酵素・基質発色反応に表現し、自動分光光度計とパソコンプログラムにより判定する。暗色ウエルは陽性反応

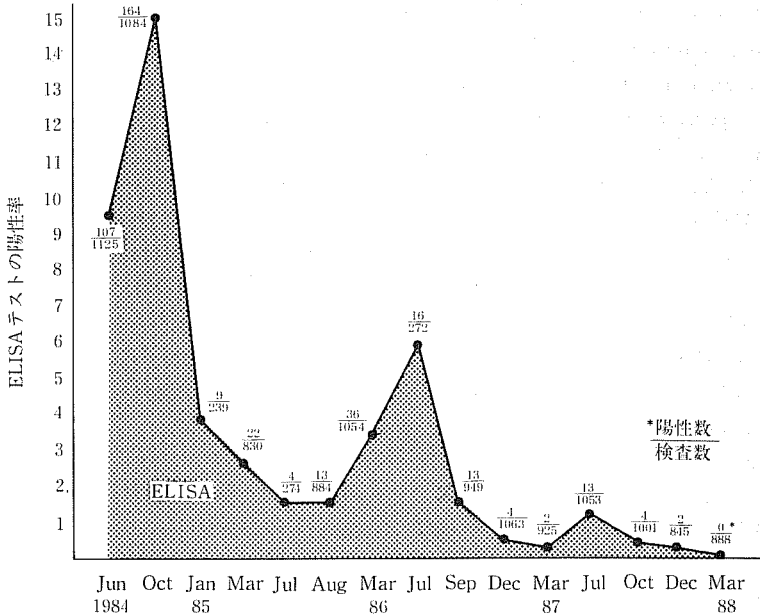


図3. ヨーネ病に汚染した大規模牛群におけるELISA抗体陽性率の推移
抗体陽性牛及び糞便培養陽性牛を定期検査ごとに淘汰した。

性牛の摘発に威力を発揮するであろう。著者が最近おこなったPCR-DNA試験キットを用いての野外試験においては培養陽性牛35頭中14頭(40%)が摘発された。PCR-DNAプローブ法の判定は2日以内であり、培養法の2カ月に比べ、排菌牛を迅速に摘発することにより、汚染の拡大防止に対し早期に対処することができる大利点がある。現段階では、排菌牛の検出感度はELISAにおよばないので、技術的な改良、特に糞便材料からのヨーネ菌の効果的分取ならびに抽出DNAの濃縮が必要であろう。

ヨーネ菌汚染群には排菌ならびに抗体応答ともに陰性の無症状保菌牛も存在しており、これらを摘発する診断技術を開発しなければ、清浄化の達成は困難である。抗体応答よりも早期に出現する細胞性免疫応答を特異的に検出するような新技術として、培養白血球へのヨーネ菌抗原刺激後のIFN γ 検出法が報告されている。ヨーネ菌感染牛の感作リンパ球の抗原刺激後のサイトカイン産生応答性は対応するcDNAに

よるmRNAのノーザンプロット法による検出も可能となるであろう。

ヨーネ病の防疫としては感染牛の摘発・淘汰にかわり、感染・発病予防の観点からの研究推進も課題として残されている。牛の腸管マクロファージ内でのヨーネ菌の増殖機構を解明することにより、ヨーネ菌増殖阻止のためのマクロファージの抗ヨーネ菌増殖抑制機能の増強技術の開発が可能となるだろう。現在、著者らは、ヨーネ菌感受性ならびに抵抗性の系統マウスを用い、これらのマウスのマクロファージ内でのヨーネ菌の増殖性の差異について、免疫細胞の機能に焦点をあわせて研究をすすめている。

(家畜衛生試験場 生理活性物質研究室長)

引用文献

1) Baess, I. (1983) : Deoxyribonucleic acid relationships between different serovars of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium scrofulaceum*. Acta. path. Microbiol. Immunol. Scand., B91, 201-203

- 2) Braun, R. K., Buergelt, C. D., Littell, R. C., Linda, S. B. and Simpson, J. R. (1990) : Use of an enzyme-linked immunosorbent assay to estimate prevalence of paratuberculosis in cattle of Florida. JAVMA., 196, 1251-1254
- 3) Chiodini, R. J., Van Kruiningen, H. J. and Merkal, R. S. (1984) : Ruminant paratuberculosis (John's disease) : the current status and future prospects. Cornell. Vet., 74, 218-282
- 4) Green, E. P., Tizard, M. L. V., Moss, M. T., Thompson, J., Winterbourne, D. J., McFadden, J. J. and Hermon-Taylor, J. (1989) : Sequence and characteristics of IS900, an insertion element identified in human Crohn's disease isolate of *Mycobacterium paratuberculosis*. Nucleic Acids Res., 22, 9063-9073
- 5) Hurley, S. S., Splitter, G. A. and Welch, R. A. (1989) : Development of a diagnostic test for John's disease using a DNA hybridization probe. J. Clin. Microbiol., 27, 1582-1587
- 6) 伊藤智司, 加藤万年, 門脇睦夫, 北村裕紀, 安藤聖, 津越充子, 田上宏明, 佐藤佳久 (1989) : 肉用牛ヨーネ病の検査成績の検討とその防疫, 家畜衛生週報. 2074号, 338-341
- 7) McFadden, J. J., Butcher, P. D., Chiodini, R. and Hermon-Taylor, J. (1987) : Crohn's, disease isolated mycobacteria are identical to *Mycobacterium paratuberculosis*, as determined by DNA probes that distinguish between mycobacterial species. J. Clin. Microbiol., 25, 796-801
- 8) Merkal, R. S. (1984) : Paratuberculosis : Advances in cultural, serologic, and vaccination methods. JAVMA., 184, 939-943
- 9) Merkal, R. S., Whipple, D. L., Sacks, J. M. and Shyder, G. R. (1987) : Prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* in ileocecal lymph nodes of cattle culled in the United States. JAVMA., 190, 676-680
- 10) Milner, A. R., Lepper, A. D., Symonds, W. N. and Gruner, E. (1987) : Analysis by ELISA and western blotting of antibody reactivities in cattle infected with *Mycobacterium paratuberculosis* after absorption of serum with *M. phlei*. Res. Vet. Sci., 42, 140-144
- 11) 高橋 修, 伊藤格郎, 横溝祐一 (1989) : ヨーネ菌による経済的損害, 臨床獣医, 7, 59-64
- 12) Tsai, S. J., Hutchinson, L. J. and Zarkower, A. (1989) : Comparison of dot immunobinding assay, enzyme-linked immunosorbent assay and immunodiffusion for serodiagnosis of paratuberculosis. Can. J. Vet. Res.
- 13) Vary, P. H., Anderson, P. P., Green, E., Hermon-Taylor, J., and McFadden, J. J. (1990) : Use of highly specific DNA probes and the polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium paratuberculosis* on John's disease., J. Clin. Microbiol., 28, 933-937
- 14) Yokomizo, Y., Merkal, R. S. and Lyle, P. A. S. (1983) : Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bovine immunoglobulin G1 antibody to a protoplasmic antigen of *Mycobacterium paratuberculosis*. AJVR., 44, 2205-2207
- 15) Yokomizo, Y., Yugi, H. and Merkal, R. S. (1985) : A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. Jpn. J. Vet. Sci., 47, 111-119
- 16) Yokomizo, Y. (1986) : Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using *Mycobacterium phlei*-absorbed serum for the diagnosis in a field study. Jap. Agricult. Res. Q., 20, 60-67
- 17) Yokomizo, Y., Nishimori, K. and Yugi, H. (1988) : Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis. A proposal of replacing the complement fixation test with the ELISA as the official diagnostic test for paratuberculosis in Japan. Second International Colloquium on paratuberculosis, Sept. 22-23, at Paris
- 18) 横溝祐一 (1985) : 牛のヨーネ病について, 日本獣医師会誌, 38, 489-495
- 19) 横溝祐一 (1989) : ヨーネ病の診断技術に関する最近の知見, 畜産の研究, 43, 150-156
- 20) 横溝祐一 (1989) : ヨーネ病をさぐる—ヨーネ病の発生状況, ヨーネ菌の特徴, 診断法と防疫対策, 臨床獣医, 7, 21-31