

## 黒毛和種におけるヨーネ菌の胎子感染

矢島りさ<sup>†</sup> 曾地雄一郎 西 清志

宮城県仙台家畜保健衛生所 (〒983-0832 仙台市宮城野区安養寺 3-11-22)

(2014年5月14日受付・2014年12月4日受理)

## 要 約

平成24年9月から25年5月に牛ヨーネ病と診断した黒毛和種妊娠牛11頭について、感染程度と胎子感染の関連性を検討した。母牛は病理組織学的検査による腸管病変の程度から重度2頭・中等度4頭・軽度5頭に分類した。細菌学的検査では母牛全頭でヨーネ菌DNAを検出(4.05E-07~1.24E+06pg/2.5 $\mu$ l)、10頭でヨーネ菌が分離された。胎子では11頭中7頭(胎齢60~250日)で菌DNAを検出(1.24E-04~7.00E-03pg/2.5 $\mu$ l)、うち1頭(胎齢250日)では菌分離も陽性となった。母牛の病態が重度なほど胎子の陽性率は上昇するが、胎子の臓器におけるDNA量は同等レベルであった。胎子への感染は最短で胎齢60日であり、妊娠初期から感染する可能性が示された。

——キーワード：胎子感染、黒毛和種、ヨーネ菌。

-----日獣会誌 68, 167~172 (2015)

ヨーネ病は数年にわたる長い潜伏期間の後、発症すると慢性的な頑固な水様性下痢や乳量低下・削瘦などを呈する疾病である。子牛への感染経路は出生後の経口感染が主体とされる。一方、出生前の胎子感染もあるとされるが、報告数が少なく、胎子への感染機構の詳細は明らかではない [1]。そこで、ヨーネ病患者と診断された黒毛和種妊娠牛11頭について、母牛の感染程度と胎子感染の関連性を病理組織学的検査、ヨーネ菌培養検査、並びにヨーネ菌遺伝子検査により検討した。

## 材料及び方法

**供試牛**：平成24年9月から平成25年5月末までに牛ヨーネ病と診断した6農場由来の妊娠牛11頭について鑑定殺後、検査を実施した。供試牛(母牛)はすべて黒毛和種で、年齢は2~11歳、その胎子は胎齢60~250日である(表1)。

**検査部位**：ヨーネ病検査マニュアル [独農研機構動物衛生研究所, 2013年3月29日版, ([http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/files/NIAH\\_yone\\_kenshou\\_130329.pdf](http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/files/NIAH_yone_kenshou_130329.pdf))] に基づく従来からの検査部位(腸管等15検体)と、独自に追加した部位を合わせた1頭あたり最大32検体を用いた。検査部位は“母牛腸管”, “母牛臓器”, “胎子”, “その他”に分類し、その内訳は下記

のとおりである。“母牛腸管”は腸管(空腸, 回腸(回盲部から上行30cm・50cm・100cm), 回盲部)及び腸管内容物, リンパ節(以下LN, 腸間膜LN(空腸・回腸), 回盲部LN), 直腸便の14検体, “母牛臓器”は肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺, 肝門LN, 肺門LN, 乳房上LNの8検体, “胎子”は肝臓, 脾臓, 腎臓, 心臓, 肺, 腸管の6検体, “その他”は羊水, 胎盤(母体側・胎子側), 臍帯血の4検体とした。

なお、解剖時には母牛の腸管内容物等により、子宮や胎子側臓器等が汚染されないように十分注意して採材を行った。特に移動可能であった体長30cm程度までの胎子は実験室に持ち帰ってから無菌的に採材を行った。胎子の腸管は胎齢により腸管全体または回盲部付近を採材し、検査に供した。

**病理組織学的検査**：剖検後、10%中性緩衝ホルマリンにて固定、常法に基づき標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色及びチールネルゼン染色後に鏡検した。また、母牛の腸管や腸管付属リンパ節における肉芽腫性病変の分布及び病変の程度、抗酸菌量に基づいて感染程度を重度、中等度、軽度の三段階に分類した。

**細菌学的検査**：培養検査は、検体1gをHexadecylpyridium Chloride (HPC, ACROS Organics, Belgium) で処理後、マイコバクチン加ハロルド培地(共

<sup>†</sup> 連絡責任者：矢島りさ(宮城県仙台家畜保健衛生所)

〒983-0832 仙台市宮城野区安養寺 3-11-22

☎ 022-257-0921 FAX 022-295-0984

E-mail : yajima-ri574@pref.miyagi.jp

黒毛和種におけるヨーネ菌の胎子感染

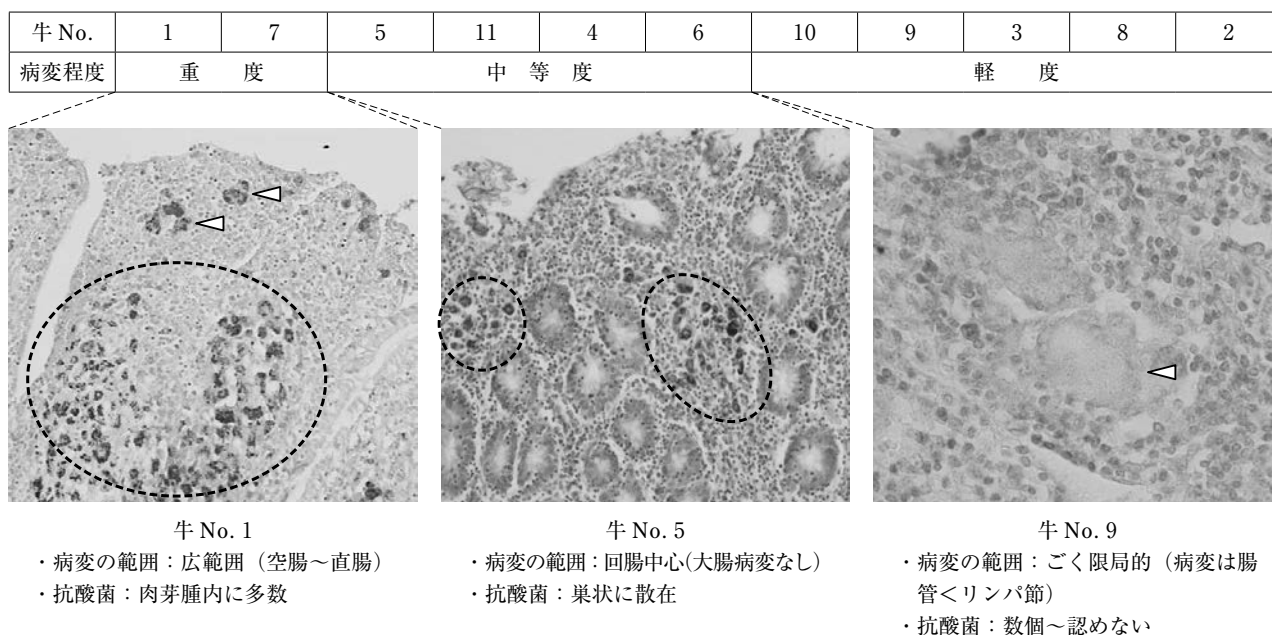


図1 母牛 病変の程度（矢頭・点線内：抗酸菌を示す）

表1 供試牛 概要

牛 No.	病性鑑定日	農場	診 断		年齢 (歳)	産地	胎齢 (日)
			検査	診断方法			
1	H24. 9.13	A	定期	qPCR(+)	11	自家産	250
2	10.10	B	定期	qPCR(+)	5	県 外	110
3	12.10	C	継続	菌分離	10	県 外	120
4	12.10	C	継続	菌分離	5	県 外	60
5	12.18	D	定期	qPCR(+)	8	県 内	80
6	12.20	D	定期	qPCR(+)	3	自家産	240
7	12.20	D	定期	qPCR(+)	5	自家産	105
8	H25. 3.23	E	継続	ELISA(+)	4	県 内	90
9	4.09	D	継続	菌分離	2	自家産	237
10	4.23	D	継続	菌分離	9	県 外	194
11	5.30	F	自主	qPCR(+)	5	県 外	200

立製薬(株, 東京)にて約3カ月間培養した。検出菌はDNA精製試薬 (InstaGene Matrix, Bio-rad Laboratories, U.S.A.)にてDNAを抽出し, nested PCR法によりヨーネ菌に特異的な挿入配列IS900を検出することにより同定した [2]。

リアルタイムPCR検査 (qPCR) は, 検体1gよりヨーネ菌核酸調整試薬 (ヨーネスピン, ㈱ファスマック, 神奈川)を用いてDNAを抽出し, ヨーネ菌検査マニュアルに基づき, 試薬 (Quantitect SYBR Green PCR Kits, QIAGEN GmbH, Germany またはヨーネジーン・KS, 共立製薬(株, 東京), qPCR装置 (7500 Real Time PCR System, Life technologies, U.S.A.)により実施した。

成 績

**母牛：**供試牛11頭は, 牛ヨーネ病定期検査及び発生農場の継続検査により患畜と診断された例が多く, 牛No. 8 (発生農場における継続発生のためELISAのみで診断)を除く10頭は, 糞便から菌分離やqPCRによりヨーネ菌DNAが検出され牛ヨーネ病患畜と診断された (表1)。

**母牛の病理学的検査：**剖検時には全頭で牛ヨーネ病の明確な臨床症状は認められなかった。病理組織学的検査ではさまざまな程度の病変を認めた。腸管病変の程度により並べると牛No. 1, No. 7, No. 5, No. 11, No. 4, No. 6, No. 10, No. 9, No. 3, No. 8, No. 2となり, 重度な病変を呈していた牛が2頭 (No. 1, 7), 中等度が4頭 (No. 5, 11, 4, 6), 軽度が5頭 (No. 10, 9, 3, 8, 2)であった (図1)。

病変が重度な2頭では空腸から結腸や直腸までの広範囲に抗酸菌を伴う肉芽腫性腸炎, 腸間膜LNに抗酸菌を伴う肉芽腫性リンパ節炎がみられた。中等度の4頭では回腸を中心に抗酸菌を伴う肉芽腫性腸炎がみられたが, 大腸に病変はみられなかった。軽度の5頭では抗酸菌をごく僅かに伴う類上皮細胞の浸潤や多核巨細胞がみられる程度であり, なかでも病変がごく軽度なNo. 8やNo. 2では腸間膜LNにおいて類上皮細胞の出現を認めたが, 標本上で抗酸菌の存在は確認できなかった。腸管以外のリンパ節や肝臓などの臓器では11頭とも剖検時や病理組織学的検査において著変は認められなかった。

**母牛の培養検査：**最も病変の軽い1頭 (No. 2)を除く10頭の腸管, 及び病変が比較的重い7頭 (No. 1, 4,

表 2-1 母牛 細菌学的検査結果

病変程度	牛 No.	培養検査										qPCR											
		重 度		中 等 度				軽 度				重 度		中 等 度				軽 度					
		1	7	5	11	4	6	10	9	3	8	2	1	7	5	11	4	6	10	9	3	8	2
腸管	空腸	粘膜	+	+	+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+			+	
		内容	+		+	+	+	+	+				+	+	+	+	+	+	+			+	
	回腸	100cm	粘膜	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+				
			内容	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+			
		50cm	粘膜	+	+	+	+		+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+		
			内容	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
		30cm	粘膜	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	
			内容	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	回盲部	粘膜	+	+	+	+		+	+	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+		
		内容	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+		
	リンパ節	空腸	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	+	+				
		回腸	+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
回盲部		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
直腸便		+	+	+	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+			
臓器	肝臓		+	+		+		+				+	+	+	+	+	+				+		
	脾臓		+	+	+							+	+	+	+								
	腎臓			+								+	+										
	心臓															+					+		
	肺			+	+		+					+	+	+	+						+		
	リンパ節	肝門 LN	+	+	+	+			+			NT	+	+	+	+		+	+				
	肺門 LN	+	+	+	+							+	+	+	+		+			NT			
	乳房上 LN	+										+	+	+	+		+			+			

培養検査 “+”：ヨーネ菌分離陽性 qPCR “+”：ヨーネ菌 DNA 検出。  
 空欄：ヨーネ菌分離陰性または qPCR 陰性 NT：検査未実施

表 2-2 母牛 腸管・臓器における qPCR 最大値・最小値

病変程度	牛 No.	母牛 腸管				母牛 臓器			
		最 大		最 小		最 大		最 小	
		DNA 量	検体名	DNA 量	検体名	DNA 量	検体名	DNA 量	検体名
重 度	1	1.02E+05	回 腸	2.06E-01	空 腸	5.48E-01	肝門 LN	1.72E-03	肺
	7	1.24E+06	回 腸	1.96E-02	空 腸	2.77E+01	肝門 LN	3.51E-04	腎 臓
中 等 度	5	2.28E+03	回 腸	4.20E+01	直腸便	1.96E-01	肝門 LN	7.86E-04	乳房上 LN
	11	4.01E+02	回 腸	1.40E+01	直腸便	1.62E-02	肝門 LN	2.39E-04	肺
	4	7.01E+02	回盲部	4.17E-02	空 腸	6.02E-04	肝 臓	1.12E-04	心 臓
	6	6.60E+02	回盲部	2.16E+01	空 腸	1.92E-03	肝 臓	1.75E-04	肺門 LN
軽 度	10	1.15E+01	回腸 LN	1.38E-02	直腸便	3.15E-04	肝門 LN	-----	
	9	9.19E-01	回盲部	3.48E-04	空 腸	-----		-----	
	3	1.16E-01	回 腸	2.78E-03	回盲 LN	4.67E-04	肺	1.17E-04	肝 臓
	8	8.64E-01	回盲 LN	6.59E-04	回腸 LN	-----		-----	
	2	6.39E-05	空 腸	4.05E-07	空腸内容	6.74E-05	乳房上 LN	-----	

qPCR 最大 DNA 量：単位 pg/2.5 μl

5, 6, 7, 10, 11) の肝臓や脾臓などの臓器からヨーネ菌が分離された。

母牛の qPCR：全頭の腸管からヨーネ菌 DNA が検出され、DNA 量は 4.05E-07pg/2.5 μl (No. 2) ~ 1.24E+06pg/2.5 μl (No. 7)、臓器では 9 頭から DNA が検出され、DNA 量は 6.74E-05pg/2.5 μl (No. 2) ~ 2.77E+01pg/2.5 μl (No. 7) と計算された (表 2-1, 表

2-2)。

病変が重度の牛は菌分離及び qPCR の陽性検体数が多く、その遺伝子量も病変の程度に伴い増加しており、細菌検査結果と病変の程度はほぼ一致した。

胎子：11 頭中 7 頭で胎子感染を認めた。

胎子の病理学的検査：胎子に病変が認められたとの報告はない [1] が、本事例でも既報と同様に剖検時及び

表3 母牛の病態と胎子の関係

病変程度	牛 No.	胎齢	胎子			その他			
			培養検査	qPCR		羊水 DNA量	胎盤		臍帯血
				DNA量	検体名		DNA量	検体名	
重 度	1	250	+	5.89E-04~ 7.00E-03	腎・心・ 肺	-	NT	NT	NT
	7	105	-	1.89E-04~ 5.24E-04	肝・腎・ 心・肺	-	1.62E-03	胎子側	NT
中 等 度	5	80	-	-	-----	-	-	-----	-
	11	200	-	3.69E-04	腸管	-	-	-----	NT
	4	60	-	1.24E-04	肝	-	-	-----	NT
	6	240	-	3.91E-04	脾	9.70E-04	2.09E-04 1.09E-06	母側 胎子側	NT
軽 度	10	194	-	-	-----	-	-	-----	-
	9	237	-	-	-----	-	-	-----	-
	3	120	-	8.69E-04	腎	-	2.53E-05	母側	NT
	8	90	-	-	-----	-	-	-----	NT
	2	110	-	2.35E-04	心	-	-	-----	NT

qPCR DNA量：単位 pg/2.5  $\mu$ l. NT：検査未実施

病理組織学的検査で胎子や胎盤に著変はみられなかった。

**胎子の培養検査：**母牛の病態が最も重度な1頭（No. 1）の腎臓・肺からヨーネ菌が分離された。

**胎子のqPCR：**7頭（No. 1, 2, 3, 4, 6, 7, 11）からヨーネ菌DNAが検出され、それらの母牛の病態はさまざまであった。母牛の病態が重度な2頭の胎子ではNo. 1が腎臓・心臓・肺から、No. 7では肝臓・腎臓・心臓・肺からヨーネ菌DNAが検出された。母牛の病態が中等度～軽度の5頭では1頭あたり1カ所のそれぞれ異なる臓器から検出された。胎子における陽性検体数は異なったものの、胎子臓器におけるDNA量は7.00E-03～1.24E-04pg/2.5  $\mu$ lとなり、母牛の病態に関係なく同等レベルであった。また、妊娠初期の胎齢60日で陽性の個体がいる一方で、妊娠後期の200日前後でも陰性の個体もあり、感染と胎齢との関連はみられなかった。胎盤あるいは羊水のqPCRが陽性の3頭はすべて胎子も陽性（No. 3, 6, 7）であった。一方、臍帯血が陰性の3頭（No. 5, 9, 10）は、胎子もすべてqPCR陰性であった。また、母牛の病態による胎子の陽性頭数と陽性率は、重度が2頭中2頭（100%）、中等度が4頭中3頭（75%）、軽度が5頭中2頭（40%）であった。母牛の病態が重度であるほど胎子の陽性率が高い結果となった（表3）。

## 考 察

黒毛和種妊娠牛11頭中7頭で胎子感染を確認した。母牛の感染程度と胎子感染について検討したところ、母牛の病態が重度なほど胎子の陽性率は上昇した。しかし母牛の病変の程度やヨーネ菌DNA量、胎齢等には関係

なく、胎子臓器でのDNA量は7頭で同等レベルであった。

母牛の病態が重度な2頭では胎子の複数の臓器で陽性となった。しかし病変が軽い5頭では胎子の1部位のみ陽性であったことから、胎子感染の証明には実質臓器や腸管など幅広い検体を検索することが重要である。また今回、母牛についても独自に検体を追加したところ、腸管病変の程度が重度な牛ほど多くの実質臓器からヨーネ菌が分離された。特に肝門リンパ節や肝臓での分離率が高く、母牛の腸管以外の臓器におけるヨーネ菌の分布を確認できた。

ヨーネ菌の胎子感染については文献によって差があるが、Whittingtonら[3]は母牛が発症している場合は約39%、臨床症状を示さない場合では約9%と報告しており、これはすべて培養検査による結果である。また、Sweeneyら[4]は培養検査で58頭中5頭（8.6%）が陽性であったと報告している。さらに、最近Adaskaら[5]は糞便培養陽性でELISAによる抗体検査が陽性か疑陽性の母牛23頭から生まれた子牛の1頭（4.3%）からのみヨーネ菌が培養によって検出されたことから、胎子感染の比率は低いと報告している。これに対し、本研究では培養検査で11頭中1頭（9.0%）、qPCRで11頭中7頭（63.6%）が陽性であった。培養での陽性率や陽性となった検体はSweeneyら[4]と同様の結果であった。Kawajiら[6]は今回用いたqPCRについて、ターゲットDNA（ヨーネ菌IS900）の1コピーを検出可能であり、実際にヨーネ菌ゲノムDNAでの試験では0.001pg/2.5  $\mu$ lのDNAを確実に検出できると述べている。さらに川治[7]は寒天培地や液体培地を用いた菌分離とqPCRの成績に関して、菌数とqPCRで検出さ

れるヨーネ菌 DNA 濃度は相関するが、qPCR 検査は感度が高く、培養検査陰性糞便が遺伝子検査で陽性となることも多いことや、qPCR の成績が 0.001pg/2.5  $\mu$ l 以上を示した糞便サンプルからは高率にヨーネ菌が分離されることを報告している。このように qPCR によるヨーネ菌 DNA の検出は培養検査に比べて高感度であるため、培養で陰性となった検体も DNA が検出され、高い陽性率となったと考えられた。

胎子への感染は胎盤を介する可能性が高いとされるが [1]、本研究においてもヨーネ菌が血行性に胎盤へ到達し、胎子の体内でも血流に乗って種々の実質臓器へ広がったと思われる。その根拠として、胎子でヨーネ菌 DNA が検出され胎盤の検査が可能であった 6 頭中 3 頭において胎盤でも DNA が検出されたこと、胎子の実質臓器中心に幅広い臓器で陽性を確認したこと、胎子が陰性であった母牛 4 頭中 3 頭 (No. 8~10) の実質臓器は陰性か僅かなヨーネ菌 DNA しか検出されなかったことがあげられる。このように、母体及び胎子の体内ではヨーネ菌が血行性に広がっていると思われるが、胎盤を通過する詳細な機構は不明である。組織学的に牛の胎盤は上皮絨毛膜性胎盤に分類され、母子の血液は胎盤関門で隔てられ直接交流することはない。胎盤節が血液栄養素の主な輸送経路であるが、胎盤節間領域は子宮腺分泌物などの組織栄養素を輸送する [8] とされる。今回、胎盤節を検査に用いたが、胎盤節間領域についても今後検討が必要と思われる。

また、胎子でヨーネ菌 DNA が検出された 7 頭のうち 6 頭は無色透明の羊膜腔液を検査し陰性であったが、1 頭 (No. 6) は黄褐色を呈する尿膜腔液でありヨーネ菌 DNA が検出されたことから、胎子の体内においては血行性だけでなくリンパ行性や消化管内を通過して尿膜腔内へ排泄される可能性も考えられる。

最短で胎齢 60 日と、妊娠初期にヨーネ菌 DNA を確認したことから、胎子への感染時期は胎齢 60 日以前と推察された。今回の症例では臨床症状を示さない牛でも

高い確率で胎子への感染を確認し、病変がほとんど認められない低排菌量の牛でも容易におこる危険性が示唆された。

今回の結果から患畜産子は分娩時にはヨーネ菌を保菌しているリスクが高いと考えられ、早期清浄化には患畜産子の対策が重要である。しかし、乳用牛とは異なり、繁殖農場では子牛が主要な収入源であるため、一見健康な臨床症状を示さない牛では対策に理解が得られにくいことがある。今回の結果を農場の指導の際に活用することで、ヨーネ病の早期清浄化に繋げていきたい。

## 引用文献

- [1] 森 康行：ヨーネ病の現況と診断・対策，家畜診療，58，139-145 (2011)
- [2] 三木隆広，森 康行，新井啓五，下地善弘，横溝祐一：DNA 簡易抽出法を用いた PCR 法によるヨーネ菌の検出および同定，臨床獣医，14，28-34 (1996)
- [3] Whittington RJ, Windsor PA : In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: A critical review and meta-analysis, Vet J, 179, 60-69 (2009)
- [4] Sweeney RW, Whitlock RH, Rosenberger AE : *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease, Am J Vet Res, 53, 477-480 (1992)
- [5] Adaska JM, Whitlock RH : Low rate of detectable in utero transmission of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in a dairy herd with a low prevalence of Johne's disease, J Vet Diagn Invest, 24, 153-155 (2012)
- [6] Kawaji S, Taylor DL, Mori Y, Whittington RJ : Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture, Vet Microbiol, 125, 36-48 (2007)
- [7] 川治聡子：ヨーネ病清浄化への新戦略，家畜衛生学雑誌，39，103-106 (2013)
- [8] 木曾康郎：胎盤，獣医組織学，日本獣医解剖学会編，第 1 版，307-323，学窓社，東京 (1999)

Fetal Infection of *Mycobacterium Avium* Subsp. *Paratuberculosis*  
in Japanese Black Cattle

Risa YAJIMA<sup>†</sup>, Yuichiro SOCHI and Kiyoshi NISHI

\*Miyagi Prefecture Sendai Livestock Hygiene Service Center, 3-11-22 Anyouji, Miyagino-ku,  
Sendai, 983-0832, Japan

SUMMARY

The association between the disease severity of the dam and fetal infection was investigated using 11 pregnant Japanese Black cows diagnosed with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) infection from September 2012 to May 2013. Histopathologically, intestinal lesions were categorized as “severe” (2 cows), “intermediate” (4 cows) and “mild” (5 cows) according to their severity. A quantitative PCR test (qPCR) detected the DNA of MAP in all of the cows ( $4.05\text{E-}07$ — $1.24\text{E+}06$  pg/ $2.5\ \mu\text{l}$ ), and MAP was isolated from 10 cows by bacterial culture. The bacterial DNA was confirmed in seven of the 11 fetuses (fetal age of 60 to 250 days) ( $1.24\text{E-}04$ — $7.00\text{E-}03$  pg/ $2.5\ \mu\text{l}$ ), and MAP was isolated from one of the DNA-positive fetuses (fetal age 250 days). The qPCR positive rate in fetuses was higher among the dams with more severe pathological and bacteriological conditions, whereas the amounts of DNA detected in the organs of the fetuses were similar, regardless of their dams’ disease status. The youngest fetal age among the infected fetuses was 60 days, indicating that the infection could occur in the early stages of pregnancy.

— Key words : infection of fetus, Japanese Black Cattle, *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

<sup>†</sup> Correspondence to : Risa YAJIMA (Miyagi Prefecture Sendai Livestock Hygiene Service Center)

3-11-22 Anyouji, Miyagino-ku, Sendai, 983-0832, Japan

TEL 022-257-0921 FAX 022-295-0984 E-mail : yajima-ri574@pref.miyagi.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 68, 167 ~ 172 (2015)