

【はじめに】

鳥型結核菌群（MAC）を主要な病原菌とする非定型抗酸菌症（AM 症）は、ヨーネ病及び結核病と類似の病変を形成するが、原因菌の分離には約 1 か月程度を要し、またその菌種同定過程は非常に煩雑である[1][2]。特に、牛における AM 症の報告は少なく、詳細はあまりわかっていない[表 1]。平成 28 年 8 月、和牛肥育農場で牛の AM 症発生事例に遭遇したので概要を報告する[11]。また、診断の過程で上がった課題をもとに MAC の迅速鑑別方法について検討したので合わせて報告する。

[表 1:牛の抗酸菌感染症の症状と病変]

	症状	病変
結核病	発咳、 <u>乳量減少、削瘦（重度）</u> 等 臨床症状が認められないことも有	肺付属リンパ節（Ly）に多い が肺外 Ly への感染もあり
ヨーネ病	慢性頑固な下痢、 <u>削瘦、泌乳量低下（重度）</u> 等 臨床症状が認められないことも有	腸間膜 Ly 腫大、腸管粘膜の肥厚 腸管に限局
AM 症	報告例が少ない	詳細は不明

【発生状況】

9 か月齢で市場から導入した去勢和牛 1 頭が発熱、食欲不振及び泥状便等の症状を呈し、抗生剤で加療したが再発を繰り返したため、約 15 か月齢で病性鑑定に供された。その際、同居牛に異常は見られなかった。

【材料及び方法】

肺、肝臓、脾臓、回腸粘膜、腸間膜リンパ節（Ly）を材料とし、細菌学的検査及び病理組織学的検査を実施した。細菌学的検査では回腸粘膜と腸間膜 Ly スタンプ標本のチールネールゼン（ZN）染色、各臓器 DNA のヨーネ病リアルタイム PCR（qPCR）、16SrRNA 配列解析、結核菌群（MTC）特異的 PCR を実施した。細菌培養は 2%小川 PS 培地で 1 か月間実施し、分離菌の 16SrRNA 配列解析[3]、hsp65 領域塩基配列解析[2]（相同性検索は動物衛生研究部門に依頼）、PCR では MAC の挿入配列である IS901[8][9]及び IS1245[10]の有無確認を実施した。今回使用した DNA 抽出キット及び使用試薬については下表のとおりである。

DNA 抽出	qPCR	コンベンショナル PCR
Instagene (菌株)	SYBRGREEN	TaKaRa Ex Taq
ヨーネスピン ver. 2 (臓器)	UDG	

また、追加試験として、①MTC と MAC の迅速鑑別法である各臓器 DNA を用いた「MTC-MAC Multiplex qPCR」 [7] を、②実験室内で可能な qPCR で hsp65 領域の 645 番目塩基を確認する方法である「hsp65 645C/T qPCR」を実施した。これは、[表 2] に示すとおり 1 塩基の違いをターゲットとした PCR で、共通の F-primer と 3'末端の 1 塩基のみがそれぞれ異なった R-primer を用いた qPCR を実施することで、遺伝子増幅スピードが可視化される手法である。例えば、分離菌が *Mah* であった場合には該当塩基が“C”であるため、遺伝子増幅スピードは「Target-C PCR」の方が「Target-T PCR」よりも 10 サイクル程度早い。

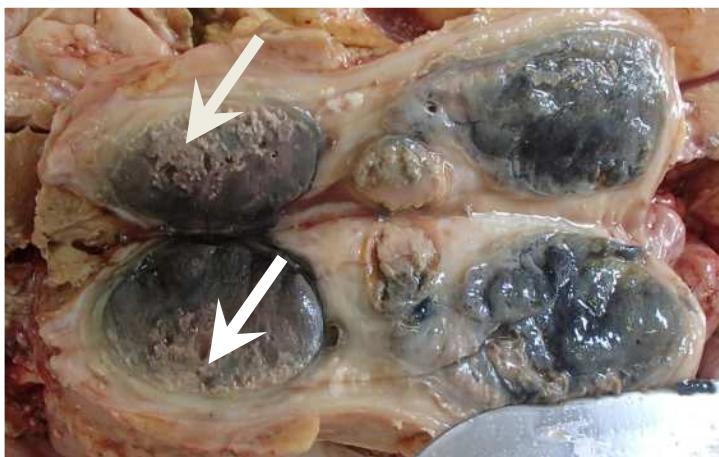
[表 2: 使用 primer の 1 塩基の違い]

	Target-T PCR	Target-C PCR
F-primer	共通 (20 塩基)	
R-primer	5' -T~~~A-3' (20 塩基)	5' -T~~~G-3' (20 塩基)

病理組織学的検査では定法に従い HE 染色、ZN 染色を実施した。

【結果】

剖検所見では回腸粘膜のわらじ様肥厚と腸間膜 Ly の腫脹及び乾酪壊死が観察され [図 1]、同スタンプ標本の ZN 染色も陽性だったが、ヨーネ病 qPCR は全検体陰性だった。他の抗酸菌症との鑑別のために実施した MTC 特異的 PCR は陽性コントロール (PC) 付近に非特異バンドが見られ、判定不能となり [図 2]、検査や防疫対応の方向性が不透明となった。最終的に全臓器から分離された抗酸菌 [図 3] と各臓器 DNA の遺伝子解析結果が [表 3] のとおりとなり、*Mycobacterium avium* (*M. avium*) 亜種鑑別に必須の hsp65 領域 645 番目の塩基が C だったため、分離菌を *M. avium* subsp. *hominissuis* (*Mah*) であると同定した。



[図 1: 腸間膜 Ly の腫脹と乾酪壊死 (矢印)]



[図 1:腸管粘膜のわらじ様肥厚]

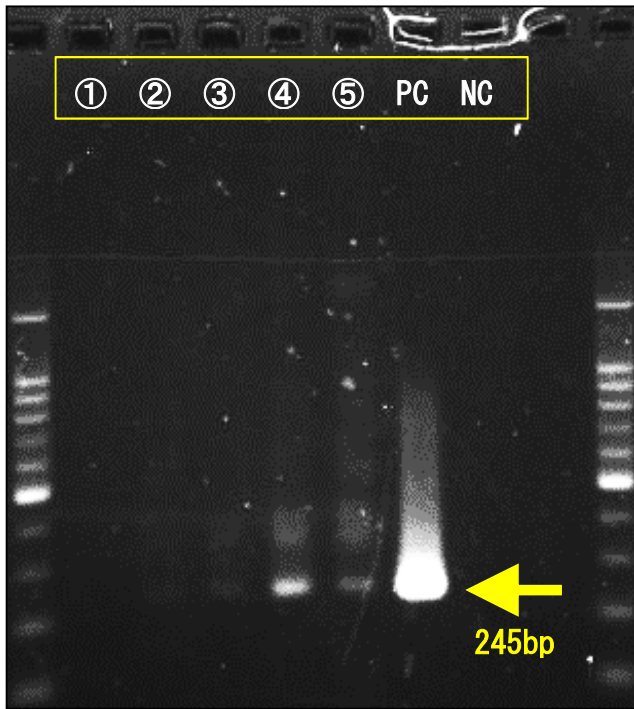
[表 3 : 臓器抽出 DNA 及び分離菌の遺伝子解析結果と MAC との比較]

	16SrRNA	IS901	IS1245	hsp65-645 番目塩基	MTC 特異的
各臓器 DNA	<i>M. avium</i>	-	+	未実施	判定不能
分離菌	<i>M. avium</i>	-	+	C	未実施
亜種 <i>hominissuis</i>	<i>M. avium</i>	-	+	C	-
亜種 <i>avium</i>	<i>M. avium</i>	+	+	T	-
亜種 <i>silvaticum</i>	<i>M. avium</i>	+	+	T	-

病理組織学的検査では全臓器に類上皮細胞の浸潤及び大量の抗酸菌の存在が確認された [図 4]。

以上より、本症例を *Mah* による牛の AM 症と診断した。

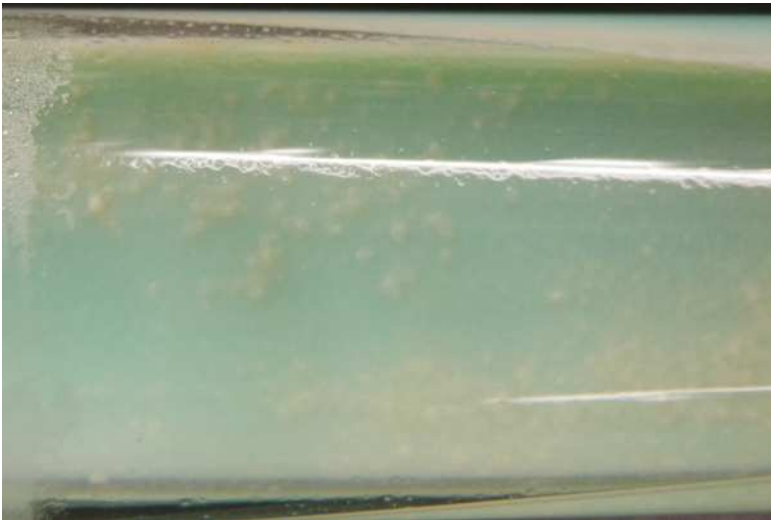
また、①MTC-MAC Multiplex qPCR では各臓器 DNA でも分離菌と同様の結果が得られ [図 5]、塩基配列解析を実施することなく、解剖後約 5 時間で MTC と MAC の鑑別が可能 [図 6] であると判明した。②*Mah* 抽出 DNA を用いた「hsp65 645C/T qPCR」では、「Target-C PCR」の方が「Target-T PCR」よりも遺伝子増幅スピードが早く確認され、実験室内での qPCR でも該当塩基が「C」か「T」であるかの鑑別が可能 [図 7]であった。



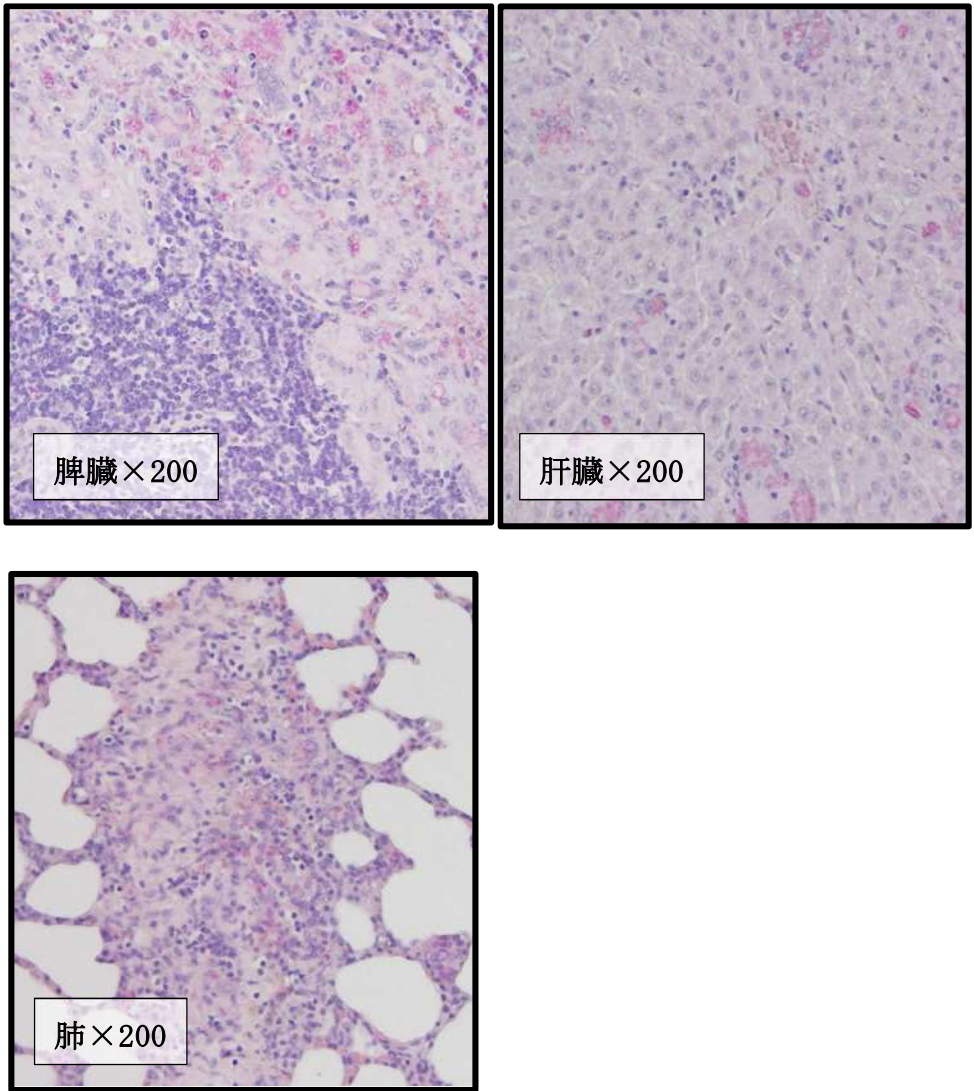
- レーン①肺
- レーン②肝臓
- レーン③脾臓
- レーン④腸管粘膜
- レーン⑤腸間膜 Ly

PC : TB 診断液 (化血研)

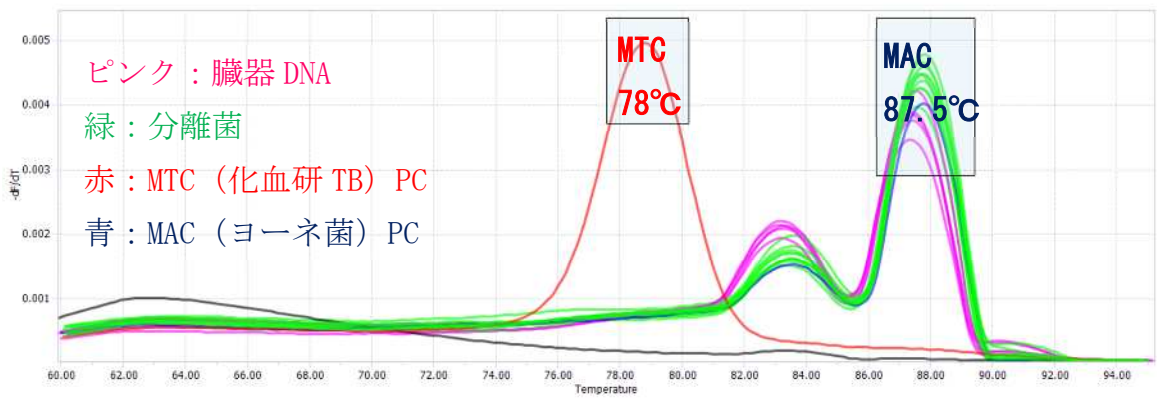
[図 2:MTC 特異的 PCR の非特異的バンド]



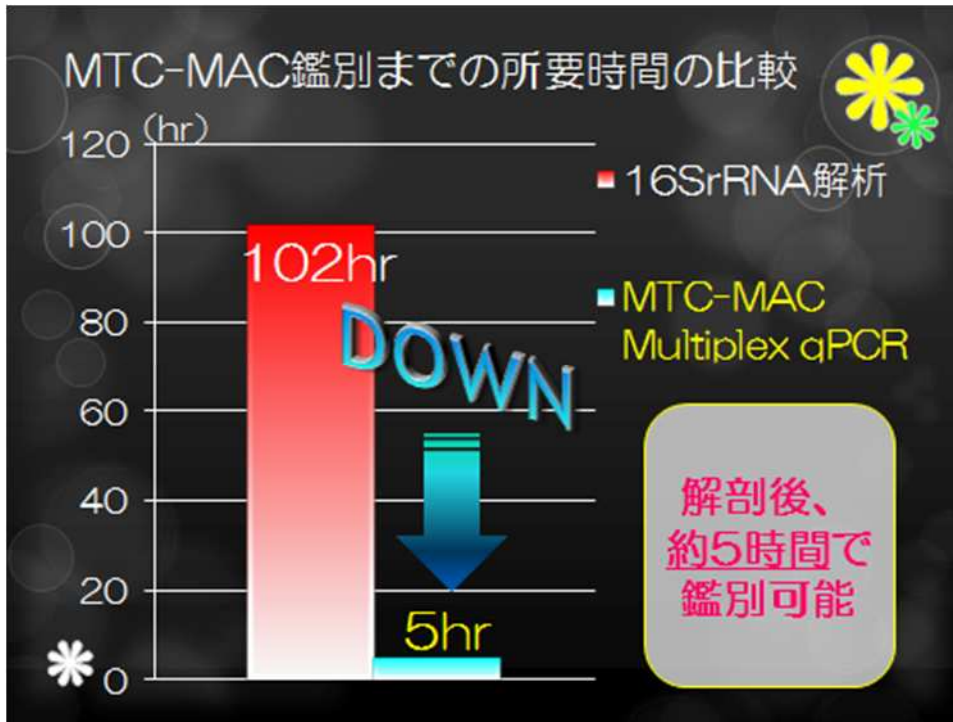
[図 3:2%小川 PS 培地上に発育した抗酸菌のコロニー]



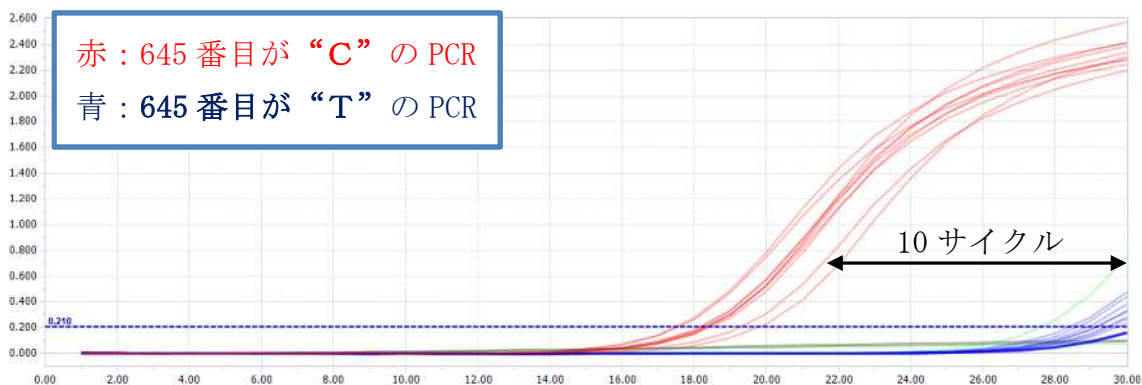
[図 4:脾臓 (左上) 肝臓 (右上) 肺 (左下) に浸潤した大量の抗酸菌 (ZN 染色)
 ※写真の赤色が全て抗酸菌の菌体]



[図 5:MTC-MAC 鑑別用 Multiplex qPCR Tm 値解析結果]



[図 6:MTC-MAC 鑑別までの所要時間の比較]



[図 7: hsp65 645C/T qPCR 増幅曲線 (遺伝子増幅スピードの違い)]

【考察】

本症例は剖検所見や病理組織学的検査ではヨーネ病及び結核病の否定は困難であった。家畜伝染病予防法施行規則別表第一の患畜診断基準によれば、「慢性で頑固な水様性下痢、栄養不良、泌乳量の低下等の臨床症状を示し、細菌検査（直接鏡検）で集塊状の抗酸菌が証明されたもの」と記載があるが、本事例は直接鏡検で抗酸菌を確認したものの、ヨーネ病とは診断できなかった。

そのため、今後同様の事例に遭遇した際は、

1. まず月齢に関わらずヨーネ病の qPCR を実施する。
2. ヨーネ病が否定された場合には、人獣共通感染症である結核病の可能性も視野に入

れた検査を実施する。

3. MTC と MAC の鑑別の際には、Multiplex qPCR も活用した迅速な検査を実施する。

4. 原因菌が *M. avium* だった場合には、qPCR を活用した亜種同定も実施する。

以上、4 つの点に着目し、検査を進めていく必要がある。なお本報告は、Journal of veterinary medical science に誌上発表されている[11]。

稿を終えるに当たり、各種ご助言ご指導を賜り、また hsp65 領域の相同性検索を実施していただいた、動物衛生部門・ヨーネ病ユニットの永田礼子先生、川治聡子先生に深謝いたします。

【参考文献】

[1]非定型抗酸菌と非定型抗酸菌症：モダンメディア 52 巻3 号

[2]Sequencing of *hsp65* Distinguishes among Subsets of the *Mycobacterium avium* Complex : JCM, Feb. 2006

[3]Determination of the Etiology of Presumptive Feline Leprosy by 16S rRNA Gene Analysis : JCM, Oct. 1997

[4]Specificity of insertion sequence-based PCR assays for *Mycobacterium tuberculosis* complex : INT J TUBERC LUNG DIS 5(6):569-574

[6]Rapid Identification of Mycobacteria to the Species Level by Polymerase Chain Reaction and Restriction Enzyme Analysis : JCM, Feb. 1993

[7]Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR : JCM, May. 2009

[8]Distribution of IS901 in Strains of *Mycobacterium avium* Complex from Swine by Using IS901-Detecting Primers That Discriminate between *M. avium* and *Mycobacterium intracellulare* : JCM, Aug, 1995

[9]Biologically Distinct Subtypes of *Mycobacterium avium* Differ in Possession of Insertion Sequence IS901: JCM, 1992, 30

[10]PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311: Mol Cell Probes. 1999 Apr

[11] Systemic mycobacteriosis caused by '*Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*' in a 14-month-old Japanese black beef steer: JVMS, Aug. 2017