

## 第 二 部



## 5. 脾臓破裂により斃死した牛伝染性リンパ腫の一例

宮古家畜保健衛生所

○川畑 敦、長濱 克徳、庄野 雪菜 ほか

家畜衛生試験場

奥村 尚子

### 【はじめに】

牛伝染性リンパ腫 (EBL) は、*Bovine leukemia virus* (BLV) が原因ウイルスであり、B 細胞性のリンパ腫が脾臓を含め、多中心性に形成される。令和 2 年のデータでは、沖縄県での発生は、全国で 7 番目に多く、EBL に対する早急な対策が必要である。県内では、2009 年から 2019 年にかけて、病理検査を実施した 80 例の EBL の内、脾臓破裂を伴う症例は本例を含め 3 例と、脾臓破裂をきたすほどのリンパ腫細胞の増殖は非常に少ない (図 1)。

今回、管内の肉用牛繁殖農家において、脾臓破裂により斃死した牛で、EBL と鑑定した症例について、その概要を報告する。

### 牛伝染性リンパ腫 (EBL)

- 原因は、牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) (腫瘍原性デルタレトロウイルス) である。
- B 細胞性の悪性リンパ腫である。
- リンパ節、脾臓、心臓、泌尿生殖器、筋肉など全身にリンパ腫が形成される。
- 令和 2 年では、沖縄県で 183 頭の EBL が報告され、全国で 7 番目に多かった。
- 県内では、過去 10 年間で 80 例の EBL の内、脾臓破裂を伴う症例は本例を含め 3 例である。

図 1 牛伝染性リンパ腫 (EBL)

### 【発生状況】

本症例は、繁殖用黒毛和種 13 歳の雌牛である。当該牛は臨床獣医師により、令和 3 年 8 月 23 日に BLV のリアルタイム PCR 検査により、高リスク牛と判定されていた。令和 3 年 9 月上旬に食欲低下の症状を示し、同月 16 日早朝に死亡しているのを畜主が発見、宮古家保で病性鑑定のため、解剖を実施した (図 2)。

### 発生状況

• 症例：  
繁殖用黒毛和種 13 歳の雌牛。

### • BLV 検査:

令和 3 年 8 月 23 日に BLV のリアルタイム PCR 検査にて、高リスク牛と判定されていた (ウイルス量 10000 以上: 高リスク牛)。  
(ウイルス量 1 回目: 333592、2 回目: 264973)

### • 稟告:

令和 3 年 9 月上旬に食欲低下の症状を示し、9 月 16 日早朝に死亡。本症例の外傷歴はない。

⇒病性鑑定のため、宮古家保で解剖。

図 2 発生状況

### 【材料と方法】

主要 5 臓器とリンパ節について HE 染色の他、CD3、CD5、CD20 の免疫組織化学的染色 (IHC) にて病理学的に検索した。また、脾臓破裂考察のため、2009 年から 2019 年にかけて、病理検査を実施し、EBL と診断された症例の内、脾臓破裂を伴っていた 1 例と脾臓破裂を伴っていなかった 3 例の HE 切片についても病理学的に検索した。

### 【結果】

肉眼所見では、腹囲は膨満しており、腹腔には約 50 l の血様腹水と大量の血餅が認められた。脾臓は著明に腫大、漿膜面には血餅が付着していた (図 3)。脾実質には、巨大血腫が認められ、血腫辺縁には裂孔が認められた (図 4)。肺では、全葉に渡り 0.5 ~ 1 cm 大の暗赤色腫瘤が散在し、心臓では、高度かつ不整に肥厚した右心耳壁と 1 ~ 2 cm 大の乳白色腫瘤が多巣状性に認められ、右心耳直下の右心房壁には、3 cm 大の乳白色充実性腫瘤が認められた。骨盤腔では、5 ~ 15 cm 大に腫大するリンパ節が 7 個認められた。

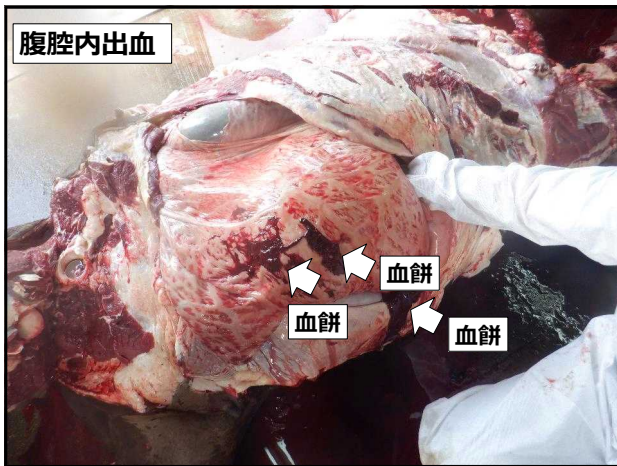


図3 肉眼所見 腹腔内出血

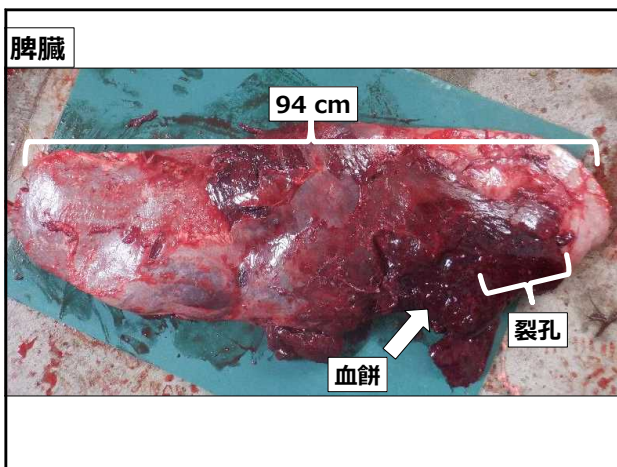


図4 肉眼所見 脾臓

病理組織学的には、脾臓の正常構造は崩壊し、小型円形腫瘍細胞が充実に増殖していた。腫瘍細胞の異型度は中程度で、分裂像はほとんど認められず、強拡大で0～2個であった(図5)。



図5 脾臓の腫瘍細胞の所見

また、特徴的所見としては、腫瘍細胞が脾柱へと浸潤し、壊死する像が多数見られたことであった(図6)。



図6 腫瘍細胞の脾柱への浸潤と壊死

脾臓被膜破綻部位では、被膜は完全に消失し、腫瘍細胞や赤血球、細胞デブリ、血漿などが被膜外へと漏出していた(図7)。

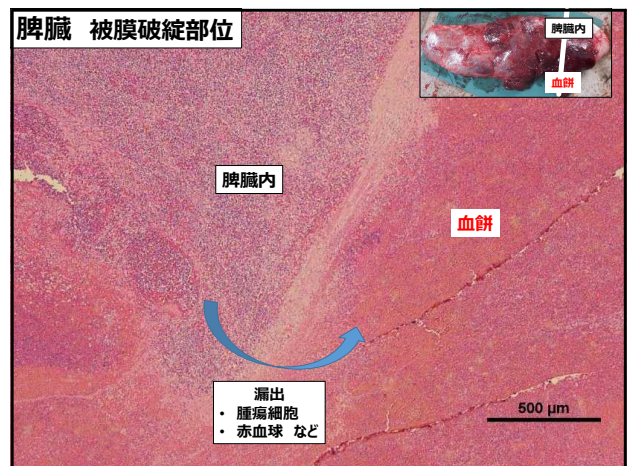


図7 脾臓被膜破綻部位

肉眼的著変のあった他臓器の病理組織学的所見は、図8示すとおりであった。本症例の病理組織学的所見をまとめると、多中心性の小型円形細胞の増殖であることから、悪性リンパ腫と診断された。

病理組織学的所見まとめ	
臓器	組織所見
脾臓	白脾髄の消失、多量の赤血球と共に小型円形腫瘍細胞の多量浸潤、脾柱内への腫瘍細胞浸潤・壊死
肺	肺胞壁の壊死、毛細血管内の多量の腫瘍細胞浸潤、肺胞腔内への腫瘍細胞浸潤
心臓	心筋細胞の断裂を伴う筋束間結合組織への腫瘍細胞浸潤
骨盤腔リンパ節	既存のリンパ節組織の崩壊、腫瘍細胞の増殖

- 病理組織学的所見：多中心性の小型円形細胞の増殖
- 病理組織学的診断名：悪性リンパ腫

**BLVとの関連性証明のため、  
免疫組織化学的に検索 (CD3, CD5, CD20)**

図 8 病理組織学的所見まとめ

IHC では CD3 は陰性、CD5、CD20 が陽性であることから、腫瘍細胞は B 細胞由来であるため、最終的に EBL と診断された (図 9)。



図 9 IHC

脾臓破裂となった原因を検討するため、脾臓破裂する EBL と脾臓破裂のない EBL の組織学的な違いについて、脾柱への腫瘍細胞浸潤と壊死に着目して検索した。

まず、EBL 症例における脾柱への腫瘍細胞浸潤・壊死の比較をした。方法は、1 症例 3 切片を選び、それぞれの切片で 10 個の脾柱をランダムに選択して壊死している脾柱をカウントし、3 切片の平均を算出して比較した。10 脾柱当たりの脾柱壊死数は、脾臓破裂 EBL 症例では、脾柱壊死が有意に増加していた (図 10)。

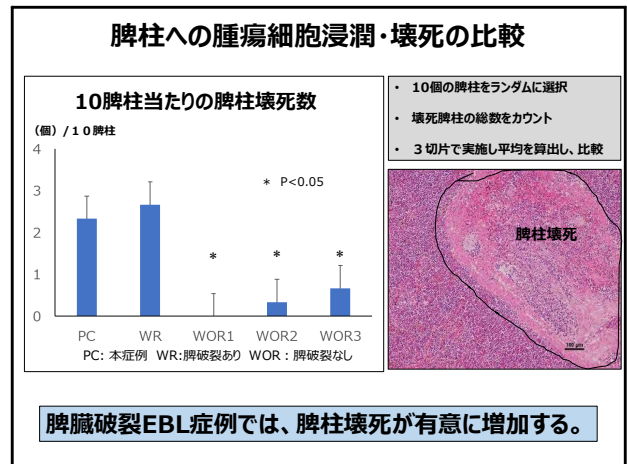


図 10 脾柱への腫瘍細胞浸潤・壊死の比較

脾柱が壊死すると、組織上からは消失していくことになると考えられるため、次に EBL 症例における組織上での脾柱数の比較をした。1 症例 3 切片を選び 100 倍で 10 視野をランダムに選択、その中の脾柱の数をカウントし、3 切片の平均を算出して比較した。100 倍 10 視野当たりの脾柱数は、脾臓破裂 EBL 症例では、脾柱数が有意に減少していた (図 11)。

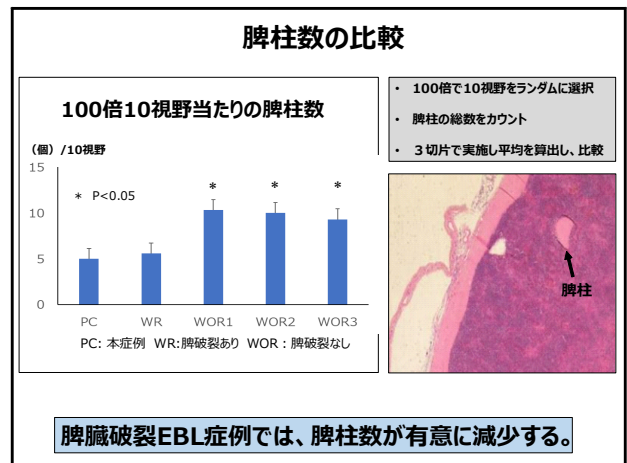


図 11 脾柱数の比較

#### 【考察】

EBL 症例で脾臓破裂を伴うものは、単純な腫瘍細胞の増殖によるものだけでなく、脾柱内に腫瘍細胞が浸潤して壊死をきたし、内部骨格の崩壊も重要な要因であることが示唆された (図 12)。

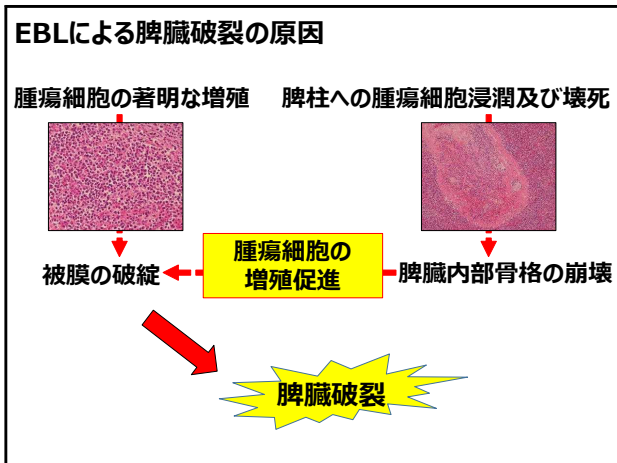


図 12 考察

## 6. 黒毛和種繁殖農場で発生した牛ボツリヌス症

中央家畜保健衛生所

○青木 雄也 荒木 美穂

岩垣 つぐみ

家畜衛生試験場

中尾 聡子

ボツリヌス症はボツリヌス菌が産生するボツリヌス毒素により引き起こされる疾病である。A型～G型に分類される毒素を産生し、弛緩性の麻痺を引き起こします。症状は起立不能、腹式呼吸、呼吸困難等を示し、致死率が高い。国内での発生は散発的であり、牛ではC型およびD型毒素による発生が多い。

### ボツリヌス症



- ・グラム陽性偏性嫌気性桿菌のボツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)
- ・ボツリヌス毒素(A型～G型)を産生し弛緩性の麻痺を引き起こす
- ・症状は起立不能、呼吸困難等で致死率が高い
- ・牛での発生は散発的でC型、D型の発生が多い

(図1)

発生地域は牛農場が97戸3200頭規模の離島で、発生農場は母牛16頭、子牛10頭を飼養する農場である。飼料は粗飼料、濃厚飼料ともに購入飼料だった。飲水は天水を利用しており消毒はされていなかった。牛舎には防鳥ネットが設置されておらず野鳥が出入り出来る状態だった。畜主は最近牛舎内でカラスがを多く見かけ、カラスの糞便も多いとの事だった。(図2)

### 農場概要

地域

牛農家97戸 3200頭の離島

農場概要

黒毛和種繁殖農場

母牛16頭 子牛10頭

飼養管理

- ・粗飼料、濃厚飼料は購入
- ・飲水は天水(未消毒)
- ・防鳥ネット未設置
- ・カラスが多い



(図2)

令和3年10月16日朝3歳の経産牛が倒れているとの稟告で臨床獣医師に往診依頼があった。食欲・活力低下、起立不能、平行失調、露舌、口唇浮腫、流涎等の症状を示し、夕方死亡した。同日夕方、同じ牛房で、もう1頭流涎の症状がみられ、翌日夕方起立不能、など同様な症状を示し19日に死亡した。18日および20日にも新たな発症がみられた。18日に臨床獣医師より家保にボツリヌス症を疑う通報があり、22日に同居牛や環境材料を採材し、28日に予後不良となった3頭目の鑑定殺を実施した。(図3)

### 発生概要

	発症日	転帰日
1頭目	10/16朝	? 16夕方死亡
2頭目	10/16夕方?	19死亡
3頭目	10/18夜	? 10/28鑑定殺
4頭目	10/20	? 回復



(図3)

一般検査の材料と方法です。血液検査は発症牛および同居牛のEDTA血、血清を用いて、血球計算機、スポットケムで各種血清生化学検査を実施。病理組織

検査は定法に従い、解剖、ホルマリン固定後組織検査を実施。細菌検査は腫瘍6臓器を用いて、血液寒天培地で好気および嫌気培養を実施。(図4)

## 材料と方法 (一般検査)

- ・血液検査
  - 材料 EDTA血、血清
  - 方法 血球計算機、スポットケム
- ・病理組織検査
  - 定法に従い解剖、組織検査
- ・細菌検査
  - 主要6臓器
  - 血液寒天培地 好気/嫌気

(図4)

血液検査結果です。血液生化学検査では全体的にAST・GGTがやや高く、ALB、BUNが低値だった。発症牛3についてはASTが高値でしたが、4日間起立不能だったため、筋肉からASTが逸脱したものと考えられた。グルコース、カルシウムも高値でしたが治療によるものと推察された。(図5)

## 血液検査結果

### 血液生化学検査

全体的 AST、GGTやや高値 ALB、BUNの低値  
発症牛3 AST、Glu、Ca高値

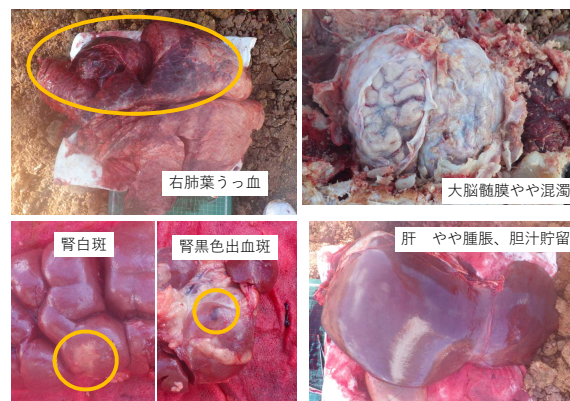
年齢	Glucose (mg/dl)	T-Chol (mg/dl)	AST (IU/L)	GGT (IU/L)	LDH (IU/L)	T-Pro (g/dl)	Alb (g/dl)	SiM (mg/dl)	Ca (mg/dl)
発症牛2	NT	82	51	46	1230	7.5	3.7	13	10.3
発症牛3	95	92	493	53	2000<	10.9	4.0	9	18.7
発症牛4	54	127	70	70	1263	8.5	3.8	12	10.1
同居牛	3	41	72	67	24	1180	8.9	2.9	8
同居牛	8	55	95	46	29	1106	7.8	3.0	5
同居牛	4	38	74	94	27	1483	6.9	3.2	7
同居牛	6	45	88	41	32	926	7.4	3.4	<5
同居牛	8	44	98	93	38	1175	8.1	3.2	5
同居牛	11	33	93	58	72	1152	7.8	2.9	<5
正常値	45~75	71~140*	45~84*	12~32*	1500~2500	6.6~7.6	3.2~3.9	10~20	8.5~12.0

※高

(図5)

病理解剖所見です。右肺のうっ血、大脳髄膜やや混濁、腎臓で白斑、黒色出血斑がみられ、肝臓はやや腫脹して、胆汁貯留がみられた。(図6)

## 病理解剖

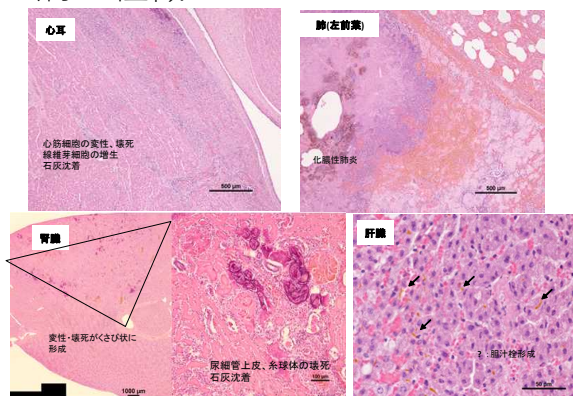


(図6)

病理組織です。心臓で壊死性小動脈炎、心筋変性及び壊死、石灰沈着。肺全葉に水腫及び出血(全葉)、前葉後部でグラム陰性菌を伴う化膿性気管支肺炎。腎で皮質を中心にくさび状に尿細管上皮の変性、壊死、糸球体上皮の壊死肝臓で胆汁栓形成がみられた。その他、膀胱粘膜下の水腫及び出血、脳幹部神経細胞への黄褐色色素沈着、第一胃の壊死性小動脈炎がみられた。(図7)

一般的にボツリヌス症では特異的な病変は無いとされていますが、多くの病変が見られたのは解剖牛は発症から解剖まで時間を要したためと思われました。

## 病理組織



(図7)

ボツリヌス検査の材料と方法です。材料は発症牛の直腸便、胃腸内容物、同居牛の直腸便、カラスの糞便、乾草、飲水とした。

①分離培養は強化クッドミート培地で2~7日間増菌培養した後、卵黄加シス테인強化GAM寒天培地で嫌気培養を実施。疑われるコロニーについて生化学性状検査、毒素型別遺伝子検査を実施。

②ボツリヌス毒素検査は発症牛の血清及び検体処理液、処理培養液を用いた。培養液はフィルター濾過



後、ゼラチン希釈液で5倍希釈しマウス腹腔内に0.5ml接種した。腹式呼吸、後軀麻痺などの特徴的な症状の発現と致死を確認されたものを陽性とした。陽性検体は中和試験を実施。抗毒素血清を30分間中和させた後0.5mlをマウス腹腔内接種し、死亡しない抗血清から毒素型を判定した。

③毒素型別遺伝子検査は分離培養液500μlを遠心後、沈渣からDNAを抽出し、C型、D型、C/D型、D/C型の毒素型別遺伝子検査を実施。陽性のみられたプライマーセットの組み合わせにより毒素型を判定した。(図8)

### 材料と方法 (ボツリヌス検査)

材料：発症牛の直腸便、胃腸内容物、同居牛の直腸便、カラスの糞便、乾草、飲水

方法：

- ①分離培養
  - 増菌培養：強化クックドミート培地で2~7日間増菌
  - 分離培養：卵黄加システイン強化GAM寒天培地で嫌気培養
  - 同定：生化学性状検査、毒素型別遺伝子検査
- ②毒素検査
  - マウス接種法：マウス腹腔内に0.5ml接種
  - 中和試験：抗C、抗D型毒素血清で中和後マウス接種
- ③毒素型別遺伝子検査
  - C型、D型、C/D型、D/C型 型別PCR

(図8)

分離培養の結果です。ボツリヌス菌分離培養検査結果は全て陰性だった。ボツリヌス毒素検査結果はカラスの糞便、発症牛③の直腸便、第一胃内容物の増菌培養液で陽性を示した。

毒素陽性検体について中和試験実施し、すべての検体でD型毒素と判定された。

カラスの糞便でD型およびC型毒素陽性と判定されました。

ボツリヌス毒素はD型毒素の一部がC型と置き換わりD/Cモザイク型が存在する事が知られており、本事例もD/Cモザイク型毒素と推察された。(図9)

### 結果 分離培養、毒素検査

- ①分離培養 全て陰性
- ②ボツリヌス毒素検査、中和試験

カラスの糞便、発症牛の直腸便と第一胃内容物、でD型毒素陽性



	発症牛③消化管内内容物						
	カラス糞便①	カラス糞便②	直腸	第一胃	第四胃	小腸	結腸
毒素検査 (検体上清)	-	-	-	-	-	-	-
毒素検査 (非加熱培養液)	+C、D型	-	+D型	+D型	-	-	-
毒素検査 (加熱培養液)	+D型	+	+	+	NT	NT	NT

(図9)

ボツリヌス毒素の遺伝子検査の結果です。

カラスの糞便、同居牛の直腸便、発症牛の検体でD9F/C26RおよびC12F/C23Rの両プライマーセットで陽性を確認、この組み合わせからD/Cキメラ陽性と判定した。(図10)

### 結果 ボツリヌス毒素の遺伝子検査

primer F/R	発症牛③消化管内内容物						
	カラス糞便①	同居牛直腸便	直腸	第一胃	第四胃	小腸	結腸
C5F/C26R	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
D9F/C26R	+/+	+/-	+/-	+/+	-/-	-/+	-/+
C12F/C23R	+/+	+/-	+/-	+/+	-/-	-/+	-/+
C12F/D15R	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

\* 結果は増菌培養前の検体の非加熱/加熱

primer F/R	C型	D型	G/Dキメラ	D/Cキメラ
C5F/C26R	+ 800bp	-	-	+ 800bp
D9F/C26R	-	+ 884bp	-	+ 884bp
C12F/C23R	+ 816bp	-	-	+ 816bp
C12F/D15R	-	+ 713bp	+ 713bp	-

(図10)

ボツリヌス毒素検査でマウスが特徴的な症状を示し死亡したためボツリヌス毒素検査陽性と判明した。中和試験によりボツリヌス毒素はD型と判明した。毒素型別遺伝子検査によりD/Cモザイク型と判明した。これらの事より、D/Cモザイク型毒素によるボツリヌス症と診断した。畜舎内にはカラスの糞便が多く見られ、カラス糞便培養液からもD型ボツリヌス毒素(D/Cモザイク型)を検出したことからカラスが感染経路の原因の一つと推察された。発生予防のためにワクチン接種や野鳥対策が重要であると考えられる。

# 7. 肉用牛繁殖農場におけるヨーネ病スクリーニング遺伝子検査の活用

家畜衛生試験場

○中尾聡子 奥村尚子 渡嘉敷美波

北部家畜保健衛生所

新田芳樹 宮良あゆみ

【はじめに】ヨーネ病はヨーネ菌の感染によって引き起こされる、牛、山羊、羊等の反芻動物の肉芽腫性腸炎で、病気の経過が極めて長く、感染から発症までに1～数年の潜伏期間がある。発症牛は持続性の下痢、泌乳量の低下、空胎期間延長、栄養状態の悪化による削瘦等を起こし、やがて死に至る。また感染牛は発症するまでの無症状時期においても糞便中にヨーネ菌を排菌することがある。ヨーネ病発生農場における清浄化対策は定期的な牛群検査による感染牛の摘発淘汰を中心に行われており、ELISA 法による抗体検査が用いられる。しかし抗体陰性排菌牛が摘発されずに農場汚染を拡大することが懸念されることから、スクリーニング遺伝子検査法が開発され、販売されている[1,2]。沖縄県では2012年12月にリアルタイムPCR法がヨーネ病診断薬に承認されて以降、2013年と2014年に乳用牛で2頭の患畜が摘発されている。しかし2019年以降は肉用牛で9頭の患畜が摘発されており、肉用牛繁殖農場におけるヨーネ病対策が課題となっている(図1)。そこでヨーネ病発生農場の早期清浄化を目的として、現行の抗体検査に加えてスクリーニング遺伝子検査を活用した2事例について報告する。

年に立入検査を実施したところ、当該牛とその産子2頭が患畜と診断された。事例2:飼養頭数115頭の肉用牛繁殖農場で、2021年に食肉衛生検査所よりヨーネ病の届出があり、出荷元農場の疫学関連農場として立入検査を実施したところ、繁殖雌牛7頭が患畜と診断された。事例1,2で摘発された患畜の月齢は0～135ヶ月齢まで様々であり、外貌所見や剖検所見ではヨーネ病を疑うような特徴的所見は見られなかったが、抗体検査、遺伝子検査、病理組織学的検査からヨーネ病と診断された(図2)。

事例 No.	月齢	外貌所見		剖検所見		抗体検査		遺伝子検査		病理組織学的検査		
		削瘦	下痢	腸粘膜	腸間膜リンパ節	ELISA	公定法	スクリーニング	肉芽腫性腸炎	肉芽腫性リンパ節炎	抗酸菌染色	
事例1-1	26	なし	なし	軽度肥厚	腫脹	1.06	45.99	陽性	+	+	+	
事例1-2	0	なし	なし	異常なし	異常なし	0.98	0.0089	陽性	-	-	+	
事例2-1	66	なし	なし	異常なし	異常なし	0.96	5.9205	陽性	+	+	+	
事例2-2	105	なし	なし	異常なし	異常なし	1.04	1.3085	陽性	+	+	+	
事例2-3	98	なし	なし	軽度肥厚	異常なし	0.41	0.0012	陽性	+	+	+	
事例2-4	108	軽度	なし	異常なし	軽度腫脹	0.45	0.0073	陽性	-	+	+	
事例2-5	135	なし	なし	軽度肥厚	異常なし	0.49	0.0015	陽性	+	-	+	
事例2-6	80	なし	なし	異常なし	異常なし	0.89	0.0036	陽性	+	+	+	
事例2-7	33	なし	なし	異常なし	異常なし	0.60	0.0093	陽性	+	+	+	

図2 ヨーネ病患畜の検査成績まとめ

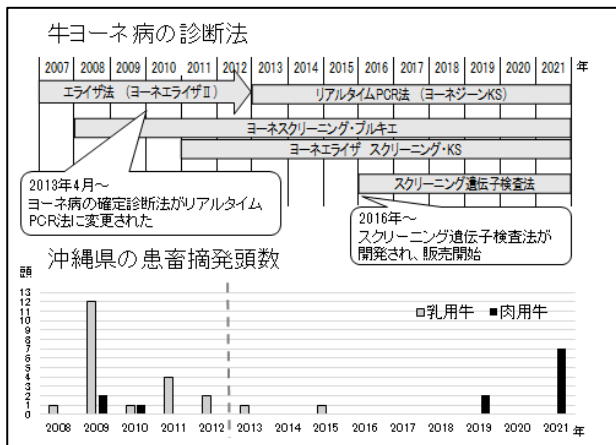


図1 牛ヨーネ病診断法と患畜摘発頭数

【発生概要】事例1:飼養頭数186頭の肉用牛繁殖農場で、県外家畜市場から導入した繁殖雌牛がヨーネ病患畜の産子であると情報提供を受けたため、2019

【材料と方法】事例1:農場全頭検査は農場飼育牛190頭を牛房ごとに2～10頭プールした28検体についてスクリーニング遺伝子検査を実施した。陽性となった検体については個別に遺伝子を抽出して再検査を実施した。環境拭き取り検査は牛床、ウォーターカップ、餌槽、通路について99検体採材し、牛房ごとに2～8ヶ所プールした28検体についてスクリーニング遺伝子検査を実施した。その後、定期的な抗体検査に加えて分娩した母牛のスクリーニング遺伝子検査を8回66頭実施した。事例2:農場全頭検査は患畜7頭を含む115頭について個別に遺伝子を抽出してスクリーニング遺伝子検査を実施した。陽性検体については検体の増幅曲線から得られたCt値と弱陽性コントロールのCt値を比較して遺伝子量を推察した。同居牛の追跡検査として6ヶ月齢以上の抗体陰性牛について、7月

は 85 頭、11 月は 87 頭のスクリーニング遺伝子検査を実施した。環境拭き取り検査は牛床、壁やスタンション、飼槽、ウォーターカップ、通路、トラックやトラクタータイヤについて、3 月は 36 検体、6 月は 36 検体、翌年 2 月は 40 検体採材し、全て個別に遺伝子を抽出してスクリーニング遺伝子検査を実施した。

**【結果】事例 1:**190 頭をプールした材料 28 検体を用いたスクリーニング遺伝子検査の結果、9 検体が陽性、19 検体が陰性だった。プール材料で陽性となった検体について個別で検査した結果、21 頭が陽性(陽性率 11.1%)だった。プール材料で陽性となった 9 検体中 4 検体は個別で検査した結果全て陰性だった。環境拭き取り検査ではプールした 28 検体中 21 検体が陽性であり、全ての牛舎で陽性が確認された。分娩した母牛のスクリーニング遺伝子検査は 66 頭全て陰性だった。事例 2:立入検査時は 115 頭中 61 頭が陽性(陽性率 53.0%)であり、患畜 7 頭は全て陽性だった。陽性牛 61 頭のうち弱陽性コントロールより Ct 値が低い牛は 8 頭であり、そのうち 5 頭が患畜だった。6 ヶ月齢以上の抗体陰性牛のスクリーニング遺伝子検査の結果、7 月は 85 頭中 8 頭が陽性(陽性率 9.4%)、11 月は 87 頭中 9 頭が陽性(陽性率 10.3%)だった。陽性母牛の追跡検査の結果、7 月は陽性牛 25 頭中 20 頭が陰性となり、11 月は陽性牛 25 頭中 22 頭が陰性となったが、中には陽転する牛や複数回にわたり陽性となる牛が見られた。環境拭き取り検査は 3 月に 36 検体中 17 検体が陽性だった。それぞれの陽性率は牛床 75% (6/8 ケ所)、壁やスタンション 63% (5/8 ケ所)、飼槽 25% (2/8 ケ所)、ウォーターカップ 0% (0/7 ケ所)、通路 100% (3/3 ケ所)、タイヤ 50% (1/2 ケ所)だった。3 ヶ月後に再検査を実施した結果、全て陰性だった。しかし翌年 2 月に実施した結果、40 検体中 2 検体が陽性であり、その内訳は陽性牛隔離牛舎の牛床と草地トラクターのタイヤだった。

**【まとめと考察】**事例 1 では患畜摘発後のスクリーニング遺伝子検査で畜舎環境から広くヨーネ菌が検出されたため、徹底した畜舎消毒を実施した。その後の検査で患畜は摘発されず、スクリーニング遺伝子検査も全て陰性だった。事例 2 では患畜摘発時のスクリーニング遺伝子検査で半数以上の牛がヨーネ菌遺伝子陽性だったが、畜舎消毒を徹底した後の再検査では陽性牛の多くが陰転した。この結果から患畜摘発時は畜舎環境が広くヨーネ菌に汚染されているため、スクリーニ

ング遺伝子検査では通過菌を検出した可能性があると考えられた。しかし陰性牛群の中には陽転する母牛が見られたため、ヨーネ病発生農場では長期的なまん延防止対策が必要であると考えられた。スクリーニング遺伝子検査は検体をプールして検出可能だが、プール材料は個々のヨーネ菌を集約して検出するため、個別で検査すると全て陰性になることがあった(図 3)。環境材料などは検体をプールすることでヨーネ菌遺伝子を高感度に検出可能となるが、同居牛検査では陽性牛を特定する必要があるため、事例 2 のような高度汚染農場では検体をプールせず個別に検査の方が効率的であると考えられた。スクリーニング遺伝子検査の判定方法は融解曲線解析で見られる解離温度で判定するが、多くの陽性検体が IC ピークと陽性ピークの両方を認め 2 峰性の曲線となるため、陽性検体が多い場合は検査結果を画像で示すのが困難だった。そこで解離曲線解析で陽性と判定した検体について、蛍光増幅曲線の立ち上がり画像を表示することで陽性検体のイメージが伝わりやすくなった(図 4)。スクリーニング遺伝子検査は PCR 阻害物質等の影響による偽陰性を避けるためにインターナルコントロールを含んでおり、ヨーネ菌遺伝子の定量はできない。しかし事例 2 で摘発された患畜 7 頭のヨーネ菌遺伝子量とスクリーニング遺伝子検査の Ct 値に相関性が見られたため、陽性検体の Ct 値からヨーネ菌遺伝子量を推定することができた。判定方法は弱陽性コントロールの Ct 値を基準として、Ct 値が低い検体を陽性(++)、Ct 値が高い検体を陽性(+)と表示した。事例 2 では陽性 61 頭中 8 頭が陽性(++)であり、患畜 7 頭中 5 頭が陽性(++)だったことから、陽性(++)の牛は特に排菌量が多いと推察された(図 5)。ヨーネ病は発生から清浄化するまでに長期的な対策が必要であり、定期的な抗体検査では摘発されない抗体陰性排菌牛が農場清浄化を遅らせることが問題となっている。そこで患畜摘発後に同居牛や環境拭き取り材料のスクリーニング遺伝子検査を行い農場の汚染状況を把握し、無症状の排菌牛を早期摘発することで本手法は農場清浄化対策に活用できると考えられた(図 6)。

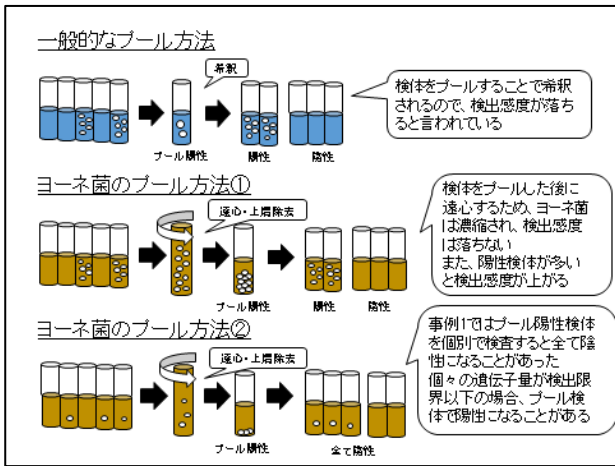


図3 プール検体の検査方法

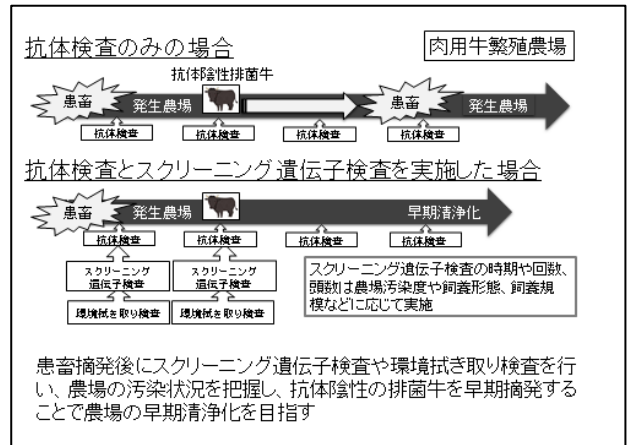


図6 発生農場におけるスクリーニング遺伝子検査の活用方法

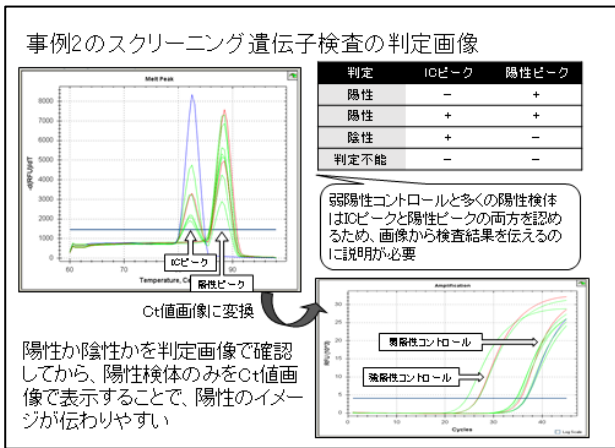


図4 スクリーニング遺伝子検査の解析方法①

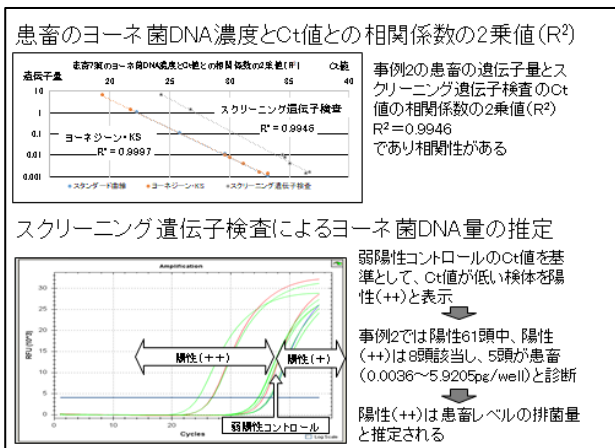


図5 スクリーニング遺伝子検査の解析方法②

【引用文献】

- [1] 永田礼子,令和2年度臨床獣医師防疫対策強化事業 特定疾病等に関する防疫技術研修,牛のヨーネ病の病性と診断, 2020
- [2] SATOKO Kawaji et al, A Novel Real-Time PCR-Based Screening Test with Pooled Fecal Samples for Bovine Johne's Disease, Journal of Clinical Microbiology, 58(12), 2020

## 8. 沖縄県のヨーネ病症例における病理学的解析

家畜衛生試験場

○奥村尚子 中尾聡子

北部家畜保健衛生所

宮良あゆみ 新田芳樹

**【背景と目的】**ヨーネ病はヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) (以下 MAP) により引き起こされる牛や山羊など反芻獣の慢性疾病である。経口的に摂取された MAP が回腸パイエル板 M 細胞から侵入し感染する。MAP はマクロファージにより貪食され、回腸パイエル板やリンパ節に初期の小肉芽腫病巣を形成した後、宿主細胞性免疫の誘起により治癒する場合と長い潜伏期間に入る場合がある。潜伏期間は2～5年とされ、2歳以下での発症は稀である。発症に至る要因として、宿主免疫応答機能の低下や栄養状態の悪化、妊娠・分娩に伴う内分泌系の変化、ストレスなどが挙げられている[1]。潜伏期間中も MAP はマクロファージ内で増殖を続け、糞便中へ排菌が認められる。

沖縄県の肉用牛農場において、2019年(事例①)と2021年(事例②)に計9頭のヨーネ病患者が摘発された。ヨーネ病は、病理組織学的に肉芽腫性腸炎に分類され、浸潤マクロファージの病変部局在や種類により大まかに病態の進行度を推察することができ、糞便中菌量と病理組織病変との相関も報告されている[2]。本県症例を病理組織学的に解析し、糞便中菌量と比較したので概要を報告する。

**【事例概要】**事例①:2017年に県外家畜市場より沖縄県内へ導入した母牛について、2019年にヨーネ病患者の産子であったと情報提供があった。当該母牛は導入後出産歴があり、ヨーネ病検査を実施した結果、母牛と子牛の2頭が患者となった。事例②:2021年に沖縄県内の食肉衛生検査所よりヨーネ病の届出があり、疫学関連農場についてヨーネ病検査を実施した結果、7頭が患者となった。

**【材料と方法】**2農場のヨーネ病患者9頭の指定採材部:空腸、回腸(回盲部から1m、50cm、30cm、10cm)、結腸、空腸リンパ節、回腸リンパ節、回盲リンパ節、乳房上(浅鼠径)リンパ節、その他心臓や肺、肝臓、脾臓、腎臓を用いて、ヘマトキシリンエオジン染色(HE染色)、抗酸菌染色(Ziehl-Neelsen染色)を実施し、鏡検

した。ヨーネ病検査として、糞便を用いたリアルタイムPCR検査(ヨーネジーン・KS)、血清を用いたエライザ検査(牛ヨーネ病診断用エライザキット)を実施した。

回盲部の組織病変について、既報[2]では以下の4種に分類し、糞便中菌量との関連が報告されている。L型(腫型)、混合型(T/L型)、類結核型(T型)、無病変型(N型)の順に糞便中菌量が多い。L型は、類上皮細胞が粘膜固有層から下組織まで広く浸潤し多核細胞やラングハンス型細胞は稀である。T型は、多核細胞やラングハンス型細胞の浸潤があり、類上皮細胞の形成は稀である。T/L型は、LとT型の両方の特徴が認められる。患者9頭の回腸病変を病理組織検査の結果に基づき、既報の4種の病型に分類し、糞便中菌量と比較した。

**【結果】**全例重度の消瘦や下痢は認められず、解剖時回腸粘膜の軽度肥厚が認められたのは9例中2例のみだった(図1)。抗体検査は全例陽性、糞便中菌量は全例定量陽性だった(図2)。

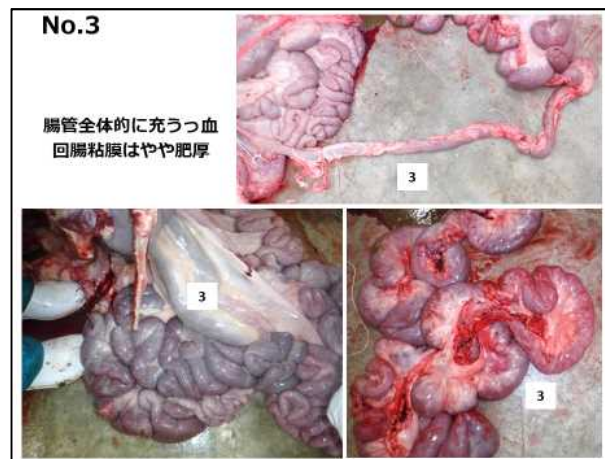


図1 No.3 腸管

検体 No.	月齢	用途	肉付	胎子	下痢の有無	抗体検査 ELISA法 (陽性 $\geq 0.3$ )	リアルタイムPCR pg/2.5 $\mu$ L (定量陽性 $\geq 0.001$ )
1	26	繁殖	普通	無	無	1.06	45.99
2	11 日齢	子牛	普通			0.98	0.0089
3	66	繁殖	普通	無		0.96	5.9205
4	105	繁殖	普通	無		1.04	1.3085
5	98	繁殖	やや肥満	無		0.41	0.0012
6	108	繁殖	やや削瘦 活気なし	無		0.45	0.0073
7	135	経産 肥育	普通	無		0.49	0.0015
8	80	経産 肥育	やや肥満	有		0.89	0.0036
9	33	経産 肥育	やや肥満	有		0.6	0.0093

・全頭下痢や重度削瘦の症状なし

図2 ヨーネ病検査の結果

病理組織検査では、主に肉芽腫性腸炎、肉芽腫性リンパ管炎がみられ、病変部の抗酸菌染色では、類上皮細胞やラングハンス型細胞、マクロファージの細胞内に濃赤色の菌体が多数みられた(図3,4,5)。腸管膜リンパ節では9例中7例で病変形成されていたが、乳房上リンパ節では全例病変はみられなかった。肝臓を採材した7例中4例について小肉芽腫巣が認められた。回腸の病理組織検査結果から病変を分類した結果、L型は該当なし、T/Lが5例(No.1,3,4,8,9)、T型が2例(No.5,7)、N型が2例(No.2,6)だった(図6,7)。T/L型5例のうち、No.1,3,4は他の2例より病変が重度だった。N型に分類されたNo.6はリンパ節には病変が認められた。それぞれの病型における糞便中菌量はT/L型が0.0036~45.99pg/2.5 $\mu$ L(平均10.646pg/2.5 $\mu$ L)、T型が0.0012~0.0015pg/2.5 $\mu$ L(平均0.0014pg/2.5 $\mu$ L)、無病変型が0.0073~0.0089pg/2.5 $\mu$ L(平均0.0081pg/2.5 $\mu$ L)、であった(図8)。



図3 No.3 回腸(HE染色)

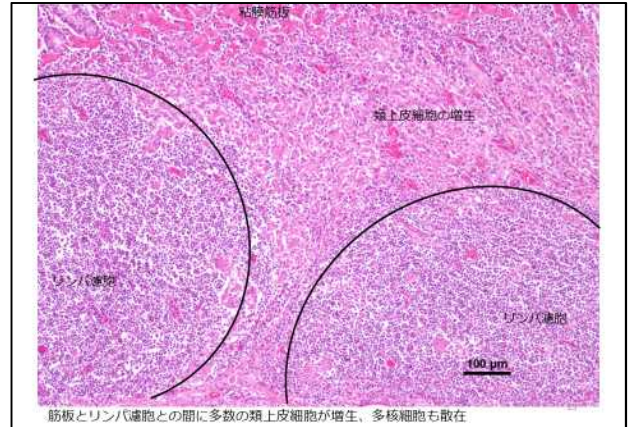


図4 No.3 回腸 粘膜下組織(HE染色)

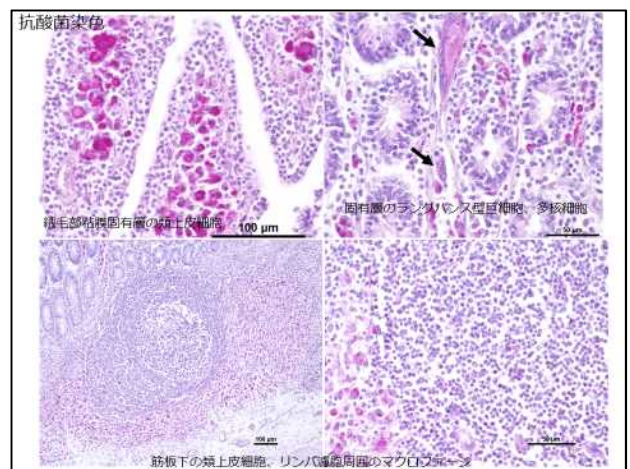


図5 No.3 回腸 (抗酸菌染色)

所在	絨毛部 粘膜固有層	粘膜下組織 (筋板下)	パイエル板、 その周囲	リンパ管内、管周囲 (下組織～筋層～腸管壁)
浸潤細胞	類上皮細胞、ラングハンス型細胞、多核細胞	類上皮細胞、ラングハンス型細胞、多核細胞	ラングハンス型細胞、多核細胞、マクロファージ	ラングハンス型細胞、多核細胞、マクロファージ、リンパ球
1	+	+	+	+
2	-	-	-	-
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	-	+	-	+
6	-	-	-	-
7	-	※空腸には病変あり	-	-
8	+	+	+	+
9	+	+	+	+

・ No.1,3,4 類上皮細胞が固有層から下組織まで浸潤 No.8,9 類上皮細胞が絨毛部のみ  
・ No.2,5,6,7 類上皮細胞形成なし (No.5と7はラングハンス型細胞あり)

図6 回腸 病理組織検査結果

	回腸 病理所見			病型	リアルタイムPCR (pg/2.5μL)
	病変形成	リンパ球型細胞, 多核細胞	類上皮細胞		
1	+	+	+	T/L型	45.99
2	-	-	-	N型	0.0089
3	+	+	+	T/L型	5.9205
4	+	+	+	T/L型	1.3085
5	+	+	-	T型	0.0012
6	-	-	-	N型	0.0073
7	+	+ ※空腸	-	T型	0.0015
8	+	+	+	T/L型	0.0036
9	+	+	+	T/L型	0.0093

図7 病型分類

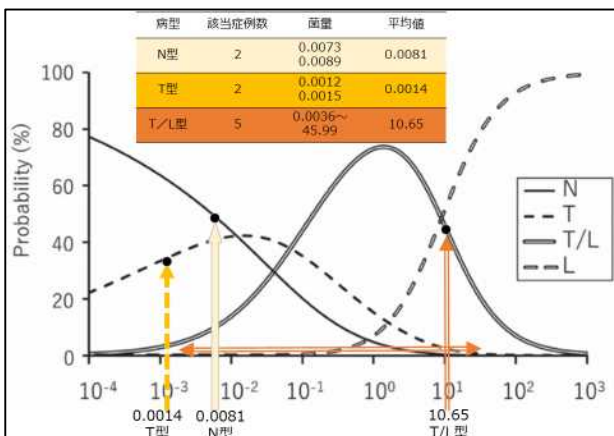


図8 病型と糞便中菌量との比較  
(谷口らの原図に追記)

**【まとめと考察】**患畜9頭は間欠性や持続性の水様性下痢や削瘦など臨床症状がなく、解剖時の所見に乏しかったため、発症前の潜伏期間中の個体と推察された。回盲部の病理組織検査結果による病型分類と糞便中菌量との関連は T/L 型 5 例の菌量平均は約 10.6pg/2.5μL で既報[2]では約 50%の発生率であり、T 型 2 例の菌量平均は約 0.0014 pg/2.5μL で約 30%の発生率、N 型 2 例の菌量平均は約 0.008 pg/2.5μL で約 50%の発生率であり、全ての病型で既報[2]範囲内であった。潜伏期間中の個体では、ヨーネ病の典型的なワラジ状の腸管粘膜肥厚を伴う病変は必ずしも認められず、病態進行度は無病変型から混合型まで、個体により様々と考えられた。

病理組織検査にて回腸には病変がない一方、リンパ節や空腸に病変がみられる場合があり、指定部位を採材することの重要性を感じた。混合型に分類した2症例(No.1と3)は、漿膜面のリンパ管炎が顕著にみられたため、解剖時に粘膜面のみならず、漿膜面側の病変も着目していきたい。ヨーネ病患者であっても肉眼的に明瞭な腸管病変を伴わない可能性に留意する必要がある。

**【引用文献】**

- [1] 永田礼子:令和2年度臨床獣医師防疫対策強化事業 特定疾病等に関する防疫技術研修 -牛のヨーネ病の病性と診断-(2020)
- [2] Yukiko TANIGUCHI., et al. : The association between detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* DNA in feces and histopathological classification. The Journal of Veterinary Medical Science, 82(5), 541-545(2020)