

【原 著】 産業動物

***Mycobacterium avium* 血清型 8 型による
無病巣ツベルクリン疑反応牛の発生**川嶋 千晶^{1,2)} 稲垣 華絵^{1,3)} 内田 桐子¹⁾ 小林亜由美⁴⁾ 神間 清恵¹⁾

1) 北海道石狩家畜保健衛生所 (〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘 3 番地)

2) 北海道十勝家畜保健衛生所 (〒089-1182 帯広市川西町基線59番地 6)

3) 北海道宗谷家畜保健衛生所 (〒098-5738 枝幸郡浜頓別町緑ヶ丘 8 丁目 3 番地)

4) 北海道後志家畜保健衛生所 (〒044-0083 虻田郡倶知安町旭15番地)

要 約

管外からの導入牛がツベルクリン接種部位の腫脹（ツベルクリン疑反応）を呈し、牛の結核病疑似患畜と診断された。ツベルクリン接種部位にはリンパ球性肉芽腫性炎がみられ、諸臓器に結核病変は認められなかったが、扁桃から非定型抗酸菌である *Mycobacterium avium* (*M. avium*) 血清型 8 型が分離された。分離された *M. avium* の感作に対するツベルクリン反応を確認するため、動物接種試験を実施した。分離菌をモルモット 3 匹（感作群）に接種し、鳥型および牛型ツベルクリンを皮内接種した。24時間後に発赤領域の大きさを計測し、発赤のあるものを陽性と判定した。感作群では全個体が両ツベルクリン陽性となり、今回分離された *M. avium* の感作はツベルクリン反応を引き起こすことが示唆された。これらのことから、当該牛のツベルクリン疑反応は、*M. avium* 感作による遅延型過敏反応と推察された。

キーワード：牛の結核病疑似患畜、非定型抗酸菌、ツベルクリン

-----北獣会誌 62, 214~218 (2018)

牛が非定型抗酸菌に感染すると、肉眼的には結核病の病巣は認められないが、ツベルクリン検査で疑反応を呈することが知られている。今回ツベルクリン疑反応を呈し、結核病疑似患畜と診断された牛 1 頭において、諸臓器に結核病変は認められなかったが、扁桃から *Mycobacterium avium* (*M. avium*) が分離された症例に遭遇した。この分離菌をモルモットに接種する動物接種試験により、ツベルクリン反応の有無を観察したのでその概要を報告する。

I. 牛の結核病疑似患畜の発生概要と病性鑑定

1. 発生概要

平成26年7月に石狩家畜保健衛生所（当所）の管外から管内農場へ導入されたヘレフォード種（雄、4カ月齢）1頭について、平成26年8月18日に結核病検査（ツベル

クリン検査皮内注射法）を実施した。8月21日の判定時、体温39.3℃、肺炎・下痢などの臨床的異状は認められなかったものの、当該牛の尾根部のツベルクリン接種部位

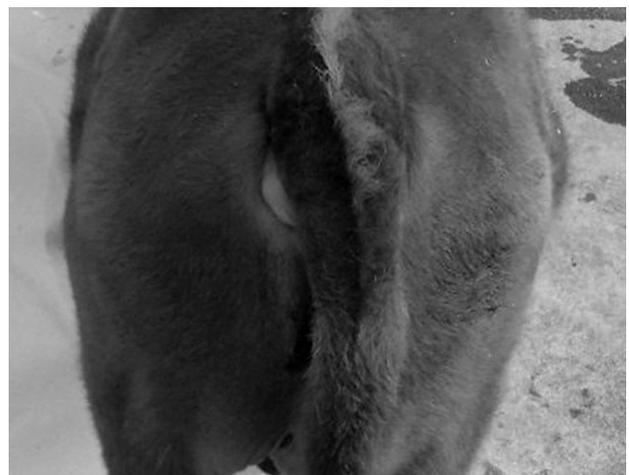


図 1. ツベルクリン接種部位の腫脹（尾根部左側）

連絡責任者：神間 清恵 北海道石狩家畜保健衛生所
〒062-0045 札幌市豊平区羊ヶ丘 3 番地
TEL 011-851-4779 FAX 011-851-4780 E-mail: jimma.kiyoe@pref.hokkaido.lg.jp

に腫脹がみられた (図 1)。硬結は認められなかったが、接種部位の腫脹差が 7 mm であったことから、結核病疑似患畜と診断した。当該牛は、家畜伝染病予防法 (法) 第 18 条に基づき、飼養者の届出により、翌 22 日に自衛殺し、病性鑑定を実施した。防疫措置として、法第 25 条に基づく飼養場所の消毒と、法第 14 条に基づく同居牛の隔離を指示した。

なお、導入牛舎には、当該牛の他に同居牛 3 頭がいたが、それぞれ個別の牛房で飼養されており、牛同士の接触はなかった。また、これらの同居牛は法第 51 条に基づき、2 回のツベルクリン検査を実施し、全頭陰性であることを確認した。

2. 病性鑑定

(1) 材料

当所で鑑定殺を行った牛の結核病疑似患畜 1 頭から、ツベルクリン接種部位、五大臓器 (心臓、肺、肝臓、脾臓、腎臓)、扁桃、リンパ節 (気管気管支、腸間膜)、胸腺、第一～四胃、腸管、大脳、小脳などを採材し、各検査に必要な部位をそれぞれ使用した。

(2) 方法

1) 病理学的検査

材料を 10% 中性緩衝ホルマリンで固定後、常法により病理組織標本を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色と、必要に応じて抗酸菌染色を行った。

2) 細菌学的検査

臓器材料からの細菌分離培養は次のように行った。一般培養は、材料を 5% 羊血液寒天培地 (日本バクテンドイッキンソン、東京) ならびに DHL 寒天培地 (栄研化学、栃木) を用いて、37°C 5% CO₂ 下および 37°C 好気下で 24~48 時間培養した。抗酸菌培養は、材料を 1% 水酸化ナトリウムで 10% 乳剤にし、Mycobacteria 7H11 Agar (日本バクテンドイッキンソン)、Tween 80 およ

びグリセリン加 1% 小川培地 (自作)、Tween 80 およびグリセリン加 2% 小川培地 (自作)^[1]、マイコバクチン加ハロルド培地 (ヨーネ菌用培地「共立」: 共立製薬、東京)、ツイーン加卵培地 (自作) の 5 種類の培地各 2 本に 100 μl ずつ接種し、37°C で 3 カ月間培養した。

Mycobacterium 属菌の遺伝子検出は、材料を滅菌蒸留水で 10% 乳剤にし、QIAamp DNA Mini Kit (キアゲン、東京) およびヨーネスピン (ファスマック、神奈川) で DNA を抽出後、*Mycobacterium* 属 16S rRNA 遺伝子を標的とした PCR 法により実施した^[2,3]。*M. avium* subsp. *paratuberculosis* (ヨーネ菌) の遺伝子検出は、材料からヨーネスピンで DNA を抽出後、ヨーネ菌の挿入配列 Insertion sequence (IS) 900 を標的としたリアルタイム PCR 法により実施した^[4]

分離された抗酸菌はマイコバクチン加ハロルド培地で純培養後、ボイル法で DNA を抽出して同定検査を実施した。PCR 法により、*Mycobacterium* 属菌、結核菌群、*M. avium*、*M. bovis*、ヨーネ菌の各遺伝子検出を実施した^[2-5]。また、核酸同定・抗酸菌群キット (DDH マイコバクテリア '極東' : 極東製薬工業、東京) を用い、DNA-DNA ハイブリダイゼーションを実施した。キットプレートの各ウェルには、表 1 のとおりに各菌種の 1 本鎖 DNA が固定してあり、キットの添付文書に従って抽出した分離菌の DNA を全ウェルと反応させた。さらに、性状確認および亜型の同定のため、培養性状検査、*Mycobacterium avium* complex の挿入配列 IS901 の検出およびその挿入部位の確認、Variable Numbers of Tandem Repeat (VNTR) 型別、血清型別を行った。

(3) 結果

1) 病理学的検査

ツベルクリン接種部位の皮下組織は、肉眼的にやや充血し、硬結を伴わない約 5 × 5 mm 大充実性の組織が認

表 1. DNA-DNA ハイブリダイゼーションの方法 (核酸同定・抗酸菌群キットプレート)

ウェルNo.	菌種	ウェルNo.	菌種	ウェルNo.	菌種
1	<i>Escherichia coli</i> (基準株)	9	<i>M. avium</i> (基準株)	17	<i>M. chelonae</i> (基準株)
2	<i>Mycobacterium bovis</i> (BCG株)	10	<i>M. intracellulare</i> (基準株)	18	<i>M. abscessus</i> (基準株)
3	<i>M. kansasii</i> (基準株)	11	<i>M. gastri</i> (基準株)	19	<i>M. peregrinum</i> (基準株)
4	<i>M. marinum</i> (基準株)	12	<i>M. xenopi</i> (基準株)		
5	<i>M. simiae</i> (基準株)	13	<i>M. nonchromogenicum</i> (基準株)		
6	<i>M. scrofulaceum</i> (基準株)	14	<i>M. terrae</i> (基準株)		
7	<i>M. goodii</i> (基準株)	15	<i>M. triviale</i> (基準株)		
8	<i>M. szufgai</i> (基準株)	16	<i>M. fortuitum</i> (基準株)		

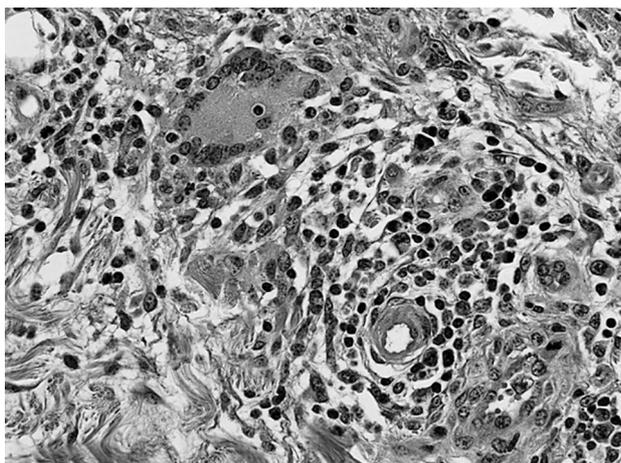


図2. 当該牛のツベルクリン接種部位にみられたリンパ球性肉芽腫性炎

められ、病理組織学的検査では、リンパ球やマクロファージが浸潤し、ラングハンス型巨細胞が形成され、典型的なツベルクリン反応像であるリンパ球性肉芽腫性炎が認められた(図2)。

肺、気管気管支リンパ節、咽頭後リンパ節に結核結節のような肉眼的所見はなく、その他諸臓器にも著変はみられなかった。病理組織学的検査でも、各臓器およびリンパ節には結核病変は認められず抗酸菌染色はすべて陰性であった。

2) 細菌学的検査

臓器材料からの一般培養において、有意菌の分離は全検体陰性であったが、抗酸菌培養では扁桃材料で培養16

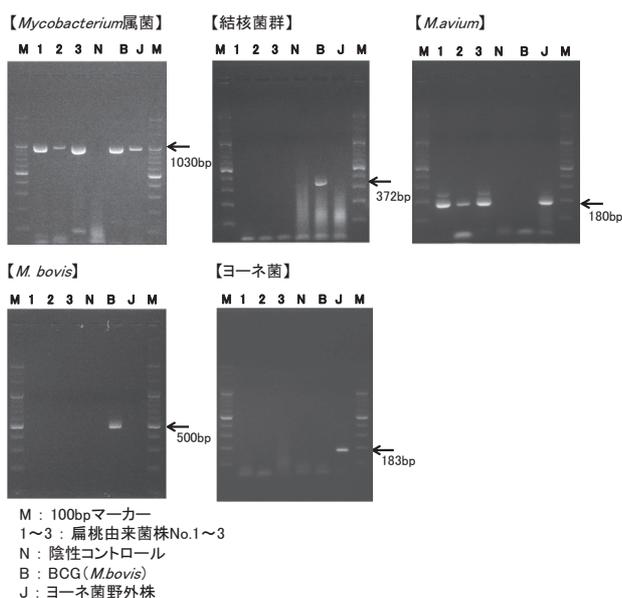


図3. 分離菌の抗酸菌遺伝子検出 (PCR法)

PCR増幅産物サイズは、*Mycobacterium*属菌が1030bp、結核菌群が372bp、*M. avium*が180bp、*M. bovis*が500bp、ヨーネ菌が183bp

日目に白色コロニーが形成され、抗酸菌染色陽性の菌が分離された。分離菌3株から*Mycobacterium*属菌および*M. avium*の遺伝子が検出された(図3)。結核菌群、*M. bovis*およびヨーネ菌遺伝子検出は全検体陰性であった。

また、DNA-DNAハイブリダイゼーションでは、*M. avium*基準株DNA固定ウェル(ウェルNo.9)で強い発色を認め(図4)、相対類似度が100%となったことから、分離菌と*M. avium*基準株のDNAの相同性が高いことが示唆された。

性状確認および亜型の同定では、分離菌株はRunyon分類のⅢ型に分類され、IS901を保有しない*M. avium*を示す300bpのPCR増幅産物陽性であった。VNTR型別プロファイルは「2221114011522322」で、血清型8型抗体にて凝集したことから、3つの亜種*M. avium* subsp. *avium*(鳥型結核菌)、*M. avium* subsp. *silvaticum*、ヨーネ菌の3つの亜種に含まれない*M. avium*(血清型8型)と同定した。

II. 動物接種試験

分離された*M. avium*の感作によるツベルクリン反応の有無を確認するため、モルモットを用いた動物接種試験を実施した。

1. 材料

供試菌は、病性鑑定で分離した*M. avium*1株を用い



図4. 分離菌を用いたDNA-DNAハイブリダイゼーションの方法

写真(左)のウェルと右図のウェルNo.は対応しており、右図のウェルNo.と表1のウェルNo.は対応している。

DNA-DNAハイブリダイゼーションでは、ウェルNo.9の*M. avium*基準株DNA固定ウェルで強い発色を認め、分離菌と*M. avium*基準株のDNAの相同性が高いことが示唆された。

た。

接種動物にはモルモット（微生物コントロール：クリーン、Hartley種、雌、6週齢、導入時体重約400g、紀和実験動物研究所、和歌山）を、供試菌感作群（感作群）および対照群に各3匹を供した。

ツベルクリンは、鳥型ツベルクリン（鳥型ツベルクリンPPD、マイコバクテリウム・アビウム4110-NIAH株使用：国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構、茨城）と牛型ツベルクリン（ツベルクリン、牛型結核菌牛10株および人型結核菌青山B株使用：一般財団法人化学及血清療法研究所、熊本）を用いた。

2. 方法

過去に非定型抗酸菌の動物接種試験を実施した方法^[6,7]に準じて、以下のとおりに実施した。

供試菌をマイコバクチン加ハロルド培地で純培養後、培養菌をPBS 1 mlに懸濁して100℃ 3時間加熱後、12,000 rpmで3分間遠心し、沈渣を少量の滅菌PBSで再懸濁後、減圧乾固した。乾固物が1.0 mg/mlとなるよう滅菌流動パラフィンに懸濁したものを抗原液とした。

モルモットの両側大腿部筋肉内に、感作群には抗原液を、対照群には滅菌流動パラフィンを、各0.3 ml接種した。

6週間の感作後、両群の背側正中の両側に、鳥型ツベルクリンを50、100、200倍、牛型ツベルクリンを500、1,000、2,000倍にそれぞれ滅菌PBSで希釈し、0.1 mlずつ皮内接種した（図5）。判定は24時間後に行い、ツベルクリン接種部位の発赤領域の大きさを計測し、発赤領域のあるものを陽性と判定した。

接種試験判定後はモルモットを安楽殺し、剖検後は各種検査を実施した。一般培養は、五大臓器、胸腺を材料として、当該牛の病性鑑定と同様に行った。抗酸菌培養は、五大臓器および胸腺を1%水酸化ナトリウムで10%乳剤にし、30分感作後、100 μlをグリセリン・OADC（Middlebrook OADC Enrichment）加Mycobacteria（日本ベクトンディッキンソン）に接種し、37℃で3カ

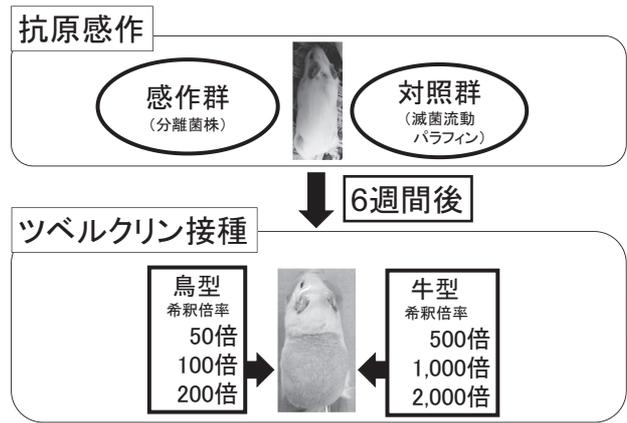


図5. モルモット接種試験の方法

月間培養した。

生化学的検査では、両群の白血球数を測定した。

病理組織学的検査では、ツベルクリン接種部位の発赤領域の病理組織標本を作製し、HE染色を実施した。

3. 結果

感作群は鳥型および牛型ツベルクリンに対して全個体陽性反応を示した（図6）。鳥型ツベルクリンに対しては、6×6～16×17 mm、牛型ツベルクリンに対しては6×6～14×14 mmの反応があり、交差反応が確認された。また、発赤領域の大きさは鳥型ツベルクリンのほうが牛型ツベルクリンよりやや大きく、強い反応がみられた。対照群は全個体で反応を示さなかった（表2）。

細菌培養では、一般細菌および抗酸菌は検出されなかった。

生化学的検査では、対照群の白血球数が4,850～5,850個/μlであったのに比べ、感作群は9,550～11,200個/μlと高値であった。

病理組織学的検査では、発赤領域皮下の筋層間の脂肪組織および結合組織に水腫や炎症性細胞の浸潤がみられた。

III. まとめおよび考察

結核病疑似患畜牛の病性鑑定を行った結果、どの臓器

表2. 感作群モルモットにおけるツベルクリン反応の発赤領域測定結果

鳥型ツベルクリン発赤領域 (mm×mm)				牛型ツベルクリン発赤領域 (mm×mm)			
希釈倍率	感作群モルモット個体No.			希釈倍率	感作群モルモット個体No.		
	1	2	3		1	2	3
50倍	14×13	10×10	17×16	500倍	14×14	11×10	14×14
100倍	6×6	10×10	14×12	1,000倍	—	9×9	12×13
200倍	11×8	10×7	10×16	2,000倍	—	8×6	6×6

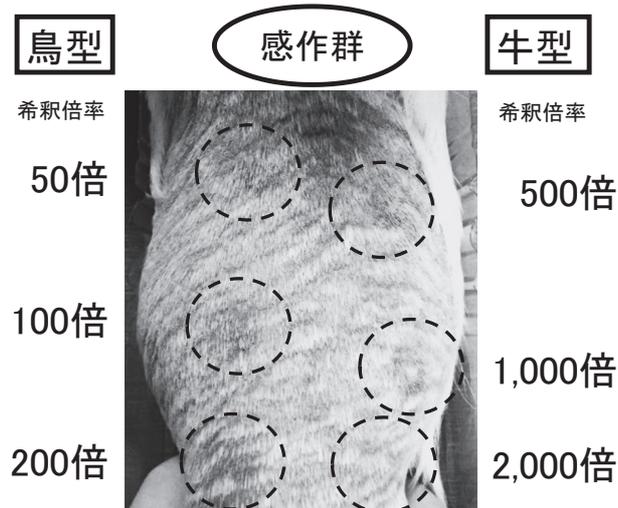


図6. 感作群モルモット (個体No. 3) のツベルクリン反応結果

点線で囲んである部分がツベルクリン接種部位であり、鳥型および牛型ツベルクリンともにすべての希釈倍率で発赤反応がみられた。

にも結核病変は認められなかった。

病理組織学的検査では、ツベルクリン接種部位に典型的なツベルクリン反応像であるリンパ球性肉芽腫性炎が認められた。細菌学的検査では、扁桃から非定型抗酸菌である *M. avium* (血清型 8 型) が分離された。以上のことから、当該牛は結核病ではなく、無病巣ツベルクリン疑反応牛 (無病巣反応牛) であると考えられた^[6-8]。

分離菌を用いたモルモット接種試験において、感作群は全個体が鳥型および牛型ツベルクリンに対して反応を示し、対照群は全個体が反応しなかったことから、今回分離された菌は遅延型過敏反応を引き起こすと推察された。

無病巣反応牛は国内外各地で発生しており、その要因として結核菌群 (*M. tuberculosis complex*)、らい菌 (*M. leprae*)、ヨーネ菌以外の非定型抗酸菌による感作が考えられており、国内では、無病巣反応牛から、*M. kansasii*^[6]、*M. scrofulaceum*^[7]、鳥型結核菌^[8]などの分離が報告されている。分離された鳥型結核菌の生菌をモルモットに腹腔内感染させ、各50倍希釈の鳥型および哺乳型 (牛型) ツベルクリンを用いた皮内反応ではともに反応がみられ、さらに鳥型ツベルクリン反応のほうが哺乳型 (牛型) よりも強くみられたとの報告や、鳥型菌感染牛の多くは無病巣か限局性病巣にとどまるとの報告もあり^[8]、今回の試験の結果と類似していた。

非定型抗酸菌は家畜の飼養環境に種々存在しており、*M. avium* も土壌などからの分離報告があり^[9-11]、今回の結核病疑似患畜牛は土壌など環境中の *M. avium* に感

作され、ツベルクリンに反応したと考えられた。

稿を終えるにあたり、今回の分離菌の性状確認および亜型の同定等、試験に御協力いただいた、動衛研の西森先生ならびに永田先生に深謝いたします。

引用文献

- [1] 田村和満、吉崎悦郎、三木寛二、坂崎利一：新細菌培地学講座・下II、坂崎利一 監修、第2版、309-311、近代出版、東京 (1990)
- [2] Kulski JK, Khinsoe C, Pryce T, Christiansen K: Use of a multiplex PCR to detect and identify *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* in blood culture fluids of AIDS patients, *J Clin Microbiol*, 33, 668-674 (1995)
- [3] 川瀬雅雄、白幡祐子、紫竹美和子、大野祥子、不二崎順二、寺尾通徳：PCR法による抗酸菌の迅速同定法の検討 - 分離菌株と喀痰について、新潟県保健環境科学研年報、16、104-106、新潟 (2001)
- [4] 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門ヨーネ病検査マニュアル2013年3月29日版
- [5] Figueiredo EES, Silvestre FG, Campos WN, Furlanetto LV, Medeiros L, Lilenbaum W, Fonseca LS, Silva JT, Paschoalin VMF: Identification of *Mycobacterium bovis* isolates by a multiplex PCR, *Braz J Microbiol*, 40, 231-233 (2009)
- [6] 桜井健一、井上 勇、斉藤憲彦、松岡俊和、栗原富男、柚木弘之：ツベルクリン反応陽性牛からの *Mycobacterium kansasii* の分離、日獣会誌、36、25-28 (1983)
- [7] 永田 進、岡田正二、鈴木新彦、神谷昌宏、沼田宏：ツベルクリン反応陽性牛からの *Mycobacterium scrofulaceum* の分離、日獣会誌、37、659-662 (1984)
- [8] 根本 久、畠山英夫、松井光蘭、柚木弘之：無病巣反応牛由来の抗酸5株について、日獣会誌、22、114-117 (1969)
- [9] 清水亀平次：牛の非定型抗酸菌感染について、日獣会誌、36、507-514 (1983)
- [10] 塚原敬典、坂本徹朗、坂本 崇、平野孝昭、工藤竜大、廣嶋精哉：褐毛和種子牛の *Mycobacterium avium Complex* 血清型 8 感染例、日獣会誌、49、13-16 (1996)
- [11] 森田幸雄、藤田雅弘、丸山総一：非定型抗酸菌と非定型抗酸菌症、モダンメディア、52、1-10 (2006)