

【原 著】 産業動物

牛のヨーネ病検査における抗 *Mycobacterium bovis* 抗体を用いた免疫組織化学染色の有用性について

谷口有紀子¹⁾ 田子 穰¹⁾ 山本 彩乃¹⁾

1) 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)

*現所属: 北海道網走家畜保健衛生所

要 約

牛のヨーネ病の病理組織検査は、腸管やリンパ節で Ziehl-Neelsen 抗酸菌染色にて菌体検出を行うことが一般的であるが、組織中の抗酸菌が少量であると検出感度が低い。そこで、より感度の高い検査として報告されている抗 *Mycobacterium bovis* (牛型結核菌) 抗体を用いた免疫組織化学染色と抗酸菌染色の染色性について比較した。リアルタイム PCR (qPCR) でヨーネ菌 DNA が検出されたが、抗酸菌染色で陰性と判定した検体であっても、免疫組織化学染色は陽性反応を示したため、免疫組織化学染色は抗酸菌染色より高感度と考えられた。

また、ヨーネ菌分布の少ない組織と考えられる乳腺組織を使用し、qPCR によりヨーネ菌 DNA が検出され、ヨーネ菌分離陽性となった乳腺組織を用いて、抗酸菌染色と免疫組織化学染色を実施した結果、免疫組織化学染色でのみ陽性反応がみられた。

以上より、抗 *Mycobacterium bovis* 抗体を用いた免疫組織化学染色は抗酸菌染色よりも感度が高い検査手法であり、特にヨーネ菌が少ない組織での菌分布を示す上で有用な検査方法と考えられた。

キーワード: 牛、ヨーネ病、*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*、病理組織検査、免疫組織化学染色

-----北獣会誌 64, 175~179 (2020)

ヨーネ病は *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (ヨーネ菌) の感染により、反芻動物に慢性の水様性下痢を引き起こす疾病で、肉眼的所見では腸管粘膜の肥厚や皺襞形成がみられ、病理組織検査では腸管粘膜固有層に多核巨細胞形成や類上皮細胞集簇といった特徴的病変の形成と、多数の抗酸菌とがみられる^[1]。抗酸菌染色方法は Ziehl-Neelsen 染色が一般的であるが、組織中の抗酸菌が少量であると検出感度が低く^[2]、菌体が貪食作用などで破壊されると染色性が低下すると報告されている^[3]。

抗酸菌を検出する方法として、結核病については抗 *Mycobacterium bovis* (牛型結核菌) 抗体を用いた免疫組織化学染色が、Ziehl-Neelsen 染色よりも高感度であると報告されているが^[4]、一方でヨーネ菌の免疫組織化学染色用特異的抗体は市販されていない。他にも組織中のヨーネ菌の検出方法として、*in situ* hybridization

法は非常に感度が高い手法^[5]であるが、検査実施に特殊な試薬や検査機器が必要である。

ヨーネ病の検査において、抗 *Mycobacterium bovis* 抗体を用いた免疫組織化学染色は、ヨーネ菌に交差性を示すことが報告されている^[6]。また、抗 *Mycobacterium bovis* 抗体を用いた免疫組織化学染色は、*in situ* hybridization 法と同等の感度を示す^[4]という報告もある。今回、Ziehl-Neelsen 染色と抗 *Mycobacterium bovis* 抗体を用いたヨーネ菌の免疫組織化学染色とで、染色性を比較するとともに、ヨーネ菌の局在が低いと考えられる組織を用いて、免疫組織化学染色の有用性について検討した。

連絡責任者: 谷口有紀子 北海道網走家畜保健衛生所

〒090-0008 北見市大正323番地 5

TEL: 0157-36-0725 FAX: 0157-36-5801 Email: taniguchi.yukiko@pref.hokkaido.lg.jp

I ヨーネ菌に対する Ziehl-Neelsen 染色と免疫組織化学染色の染色性の比較

1. 材料および方法

(1) 材料

2016年5月～2018年2月に法令殺を実施した牛ヨーネ病患者のうち、腸管の病理組織所見で回腸病変が最も軽度な病型とされる限局性多核巨細胞形成がみられた類結核型^[7]を呈する24頭（No.1～24；乳用牛16頭、肉用牛8頭）を供試した。採材は死後1日以内に実施した。

(2) ヨーネ菌遺伝子検査

直腸便は家畜伝染病予防法施行規則別表第一に基づき、リアルタイムPCR（qPCR）による検査を実施した。回腸粘膜および回腸リンパ節は各検体1gを滅菌蒸留水10mlでホモジナイズし、10%臓器乳剤1mlを用いて、qPCRにより組織中のヨーネ菌DNAを検出した^[8]。DNA抽出にはヨーネスピ（ファスマック、神奈川）を用い、ヨーネ菌DNA検出キットはヨーネジーン・KS（共立製薬、東京）を用い、qPCR装置はLightCycler 480 II（ロシュ・ダイアグノスティック、東京）を使用した。

(3) 病理組織標本の作製法と染色法

回腸および回腸リンパ節を摘出後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従いパラフィンブロックを作製した。ミクロトームで2～3μmの連続切片を作製し、以下の染色を実施した。

1) Ziehl-Neelsen 染色

標本を脱パラフィン後、チール・カルボールフクシン液（武藤化学、東京）で30分反応させ、1%塩酸アルコールで脱色し、レフレルカリメチレンブルー液（武藤化学）で10秒間後染色を実施した。

2) 免疫組織化学染色

標本を脱パラフィン後、一次抗体としてウサギ抗 *Mycobacterium bovis* ポリクローナル抗体（DAKO、デンマーク）を使用し、0.1%トリプシン加PBSおよび0.3% H₂O₂加メタノールで前処理を行い、市販の免疫組織化学検査キット（ヒストファインシンプレステインSAB-PO（M）：ニチレイバイオサイエンス、東京）と発色液（DABトリス錠：武藤化学）を用いて染色を実施した。

(4) 染色性スコア

画像処理ソフトImageJ（version 1.51：US NIH、米国）^[9-11]を用いて染色性を評価した。光学顕微鏡下400倍率において、Ziehl-Neelsen 染色および免疫組織化学

表 1. 染色性スコア

判定	陽性面積割合
－	陽性反応なし
＋	0%＜、≤5%
＋＋	5%＜、≤10%
＋＋＋	10%＜

染色で最も強い陽性反応がみられた視野の画像を使用して陽性面積を測定し、染色性をスコア化した（表1）。

2. 成績

(1) ヨーネ菌遺伝子検査

検査を実施した全ての回腸粘膜および回腸リンパ節検体からヨーネ菌DNAを検出した（表2）。

(2) 病理組織染色

回腸ではZiehl-Neelsen 染色で24検体中5検体に陽性反応がみられ、免疫組織化学染色では24検体中7検体に陽性反応がみられた（表2）。陽性反応は概ね多核巨細胞内にみられ（図1）、一部粘膜固有層内にもみられた。

回腸リンパ節ではZiehl-Neelsen 染色で24検体中8検体に陽性反応がみられ、免疫組織化学染色では24検体中11検体に陽性反応がみられた（表2）。陽性反応は概ね多核巨細胞内の菌に一致してみられ、一部実質内にもみられた。

(3) 染色性スコア

Ziehl-Neelsen 染色と免疫組織化学染色で染色性の判定スコアが異なるものは回腸で4検体（No.1、2、7、18）（表2）、回腸リンパ節で6検体（No.1、4、6、12、14、20）となり（表2）、いずれも免疫組織化学染色の方が判定スコアは高かった。なかでも、Ziehl-Neelsen 染色で陰性と判定された検体のうち、回腸で2検体（No.1、7）、回腸リンパ節で3検体（No.1、4、20）が免疫組織化学染色陽性と判定された。

II 乳腺組織を用いたヨーネ菌抗原の検出

ヨーネ菌が少ないと考えられる乳腺組織を用いて、ヨーネ菌抗原の検出を実施した。検査にはヨーネ菌DNAを検出し、ヨーネ菌分離を確認した乳腺組織を供した。

1. 材料および方法

(1) 材料

2017年6月～2018年2月に法令殺を実施し、病理組織検査に供した牛ヨーネ病患者63頭のうち、乳腺組織からヨーネ菌DNAを検出し、かつヨーネ菌を分離した13頭（No.25～37；乳用牛11頭、肉用牛2頭）を供試した。採材は死後1日以内に実施した。

表 2. 回腸および回腸リンパ節における Ziehl-Neelsen 染色および免疫組織化学染色の染色性スコア

牛 No	乳用／肉用	直腸便中 DNA 量	回腸			回腸リンパ節		
			組織中ヨーネ菌 DNA 量	染色性スコア		組織中ヨーネ菌 DNA 量	染色性スコア	
				ZN	IHC		ZN	IHC
1	乳用	0.477	4.460	—	+	174.000	—	+
2	乳用	0.103	4.800	+	++	2.580	NT	NT
3	肉用	0.028	9.200	—	—	4.500	—	—
4	肉用	0.008	15.100	+	+	1.390	—	+
5	肉用	0.385	28.700	—	—	7.300	—	—
6	乳用	0.309	45.500	—	—	3.370	+	++
7	乳用	0.001	0.491	—	+	0.025	+	+
8	乳用	0.002	0.952	—	—	0.259	—	—
9	乳用	0.060	3.570	—	—	1.590	—	—
10	乳用	0.692	27.300	—	—	19.600	+	+
11	乳用	3.030	469.000	—	—	5.220	+	+
12	乳用	0.383	18.800	—	—	53.700	+	++
13	乳用	0.841	34.900	—	—	1.320	+	+
14	乳用	0.130	29.000	—	—	89.500	+	++
15	肉用	0.006	0.191	+	+	24.200	—	—
16	乳用	0.004	0.476	—	—	8.660	—	—
17	肉用	0.013	4.700	—	—	4.320	—	—
18	肉用	0.017	NT	+	++	NT	—	—
19	肉用	0.005	545.000	—	—	NT	—	—
20	乳用	0.400	0.941	—	—	0.164	—	++
21	乳用	0.007	1.530	—	—	0.052	—	—
22	肉用	0.008	3.840	+	+	0.320	—	—
23	乳用	0.010	2.320	—	—	19.800	+	+
24	乳用	0.010	58.700	—	—	1.420	—	—

ヨーネ菌 DNA 量 (pg/2.5 μ l)、分離菌量 (cfu/g)

ZN: Ziehl-Neelsen 染色、IHC: 免疫組織化学染色

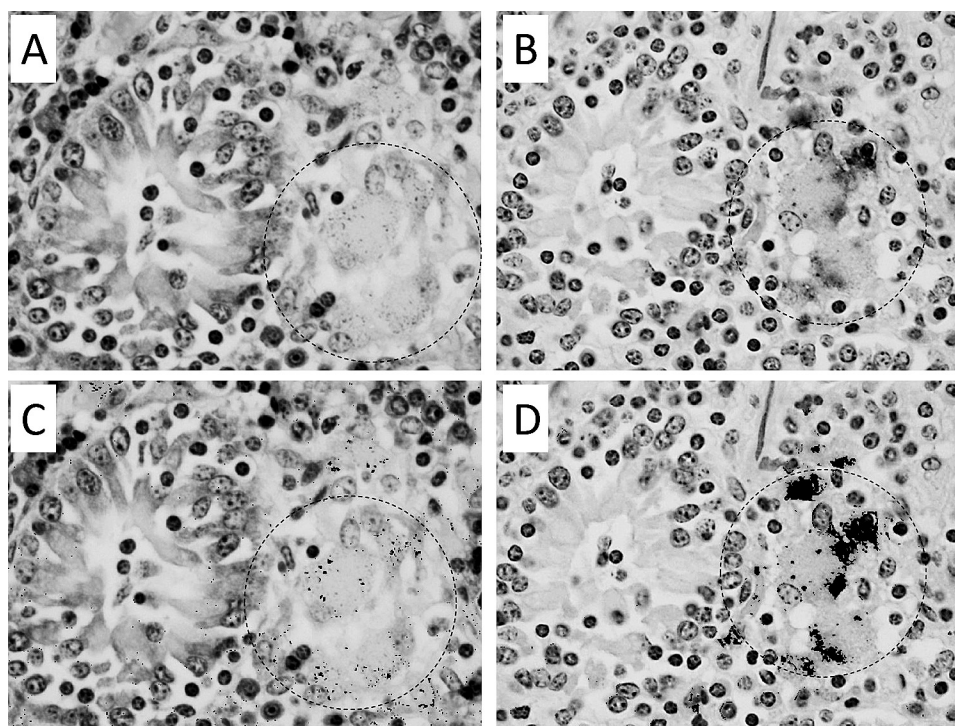


図 1. 回腸 (牛 No 2)

(A: Ziehl-Neelsen 染色、B: 免疫組織化学染色、C: Ziehl-Neelsen 染色 ImageJ 処理後、D: 免疫組織化学染色 ImageJ 処理後)

多核巨細胞 (丸印) 内に抗酸菌がみられ、ImageJ 処理で陽性反応が黒色部位として表示された

(2) ヨーネ菌遺伝子検査

乳腺組織 1 g を滅菌蒸留水 10 ml でホモジナイズし、10%臓器乳剤 1 ml を用いて、前述と同様の方法で組織中のヨーネ菌 DNA を検出した^[8]。

(3) 培養検査

乳腺組織 1 g を滅菌蒸留水 10 ml でホモジナイズし、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）を用いて 3 カ月間 37℃ 下で培養し、培地あたりの分離コロニー数を計数した^[8]。

(4) 病理組織標本の作製法と染色法

乳腺組織を摘出後、10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、常法に従いパラフィンブロックを作製した。ミクロトームで 2～3 μm の連続切片を作製し、前述と同様の方法で Ziehl-Neelsen 染色およびウサギ抗 *Mycobacterium bovis* ポリクローナル抗体を用いた免疫組織化学染色を実施した。

2. 成績

(1) ヨーネ菌遺伝子検査および培養検査

ヨーネ病患畜 63 頭のうち、13 頭の乳腺組織からヨーネ菌 DNA を検出すると共に、ヨーネ菌を分離した（表 3）。

(2) 病理組織検査と染色性評価

13 頭全ての乳腺組織において、類上皮細胞のびまん性増殖やラングハンス巨細胞の出現などヨーネ病に特徴的な所見はみられず、炎症性細胞浸潤もみられなかった。Ziehl-Neelsen 染色ではいずれの検体でも抗酸菌は確認されなかったが、免疫組織化学染色では 13 検体中 5 検体で陽性反応がみられた（No. 25、30、33、36、37）（表

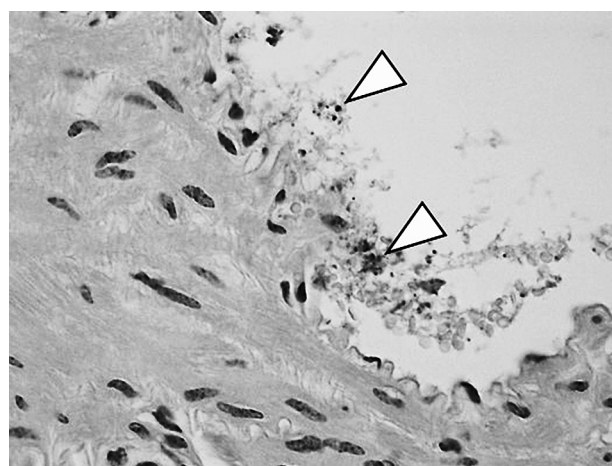


図 2. 乳腺（牛 No37）
乳汁中内に陽性反応がみられた（矢頭）

3）。陽性反応は血管内や乳汁内にわずかに認められた（図 2）。

Ⅲ 考 察

ヨーネ病患畜の回腸および回腸リンパ節の抗 *Mycobacterium bovis* 抗体を用いた免疫組織化学染色は、Ziehl-Neelsen 染色より高い検出感度を示しており、Brees ら^[5]や Verin ら^[6]が述べているように、免疫組織化学染色が感度の高い検査手法であることが示された。

この染色性の違いについては、Ziehl-Neelsen 染色が抗酸菌の細胞壁に含まれるミコール酸の染色性を利用した方法なのに対して、免疫組織化学染色は特異的抗原を検出する方法である。そのため、マクロファージ内など

表 3. 乳腺組織における Ziehl-Neelsen 染色および免疫組織化学染色の染色性スコア

牛 No	乳用／肉用	直腸便中 ヨーネ菌 DNA 量	組織中 ヨーネ菌 DNA 量	組織中 分離菌量	病変形成	乳用腺組織		
						染色性スコア		
						ZN	IHC	IHC 陽性部位
25	乳用	2. 210	0. 0020	12	—	—	+	血管内
26	乳用	0. 477	0. 0297	120	—	—	—	
27	乳用	42. 100	0. 2630	600	—	—	—	
28	肉用	0. 000	0. 0057	12	—	—	—	
29	肉用	97. 800	0. 0027	12	—	—	—	
30	乳用	0. 777	0. 0034	12	—	—	+	乳用汁内
31	乳用	45. 700	0. 0004	12	—	—	—	
32	乳用	2. 080	0. 0026	24	—	—	—	
33	乳用	4. 620	0. 0007	12	—	—	+	乳用腺実質
34	乳用	0. 187	0. 0008	12	—	—	—	
35	乳用	2. 540	0. 0220	36	—	—	—	
36	乳用	3. 030	0. 0013	12	—	—	+	血管内、乳用汁内
37	乳用	0. 383	0. 0097	48	—	—	+	乳用汁内

ヨーネ菌 DNA 量（pg/2.5 μl）、分離菌量（cfu/g）

ZN：Ziehl-Neelsen 染色、IHC：免疫組織化学染色

で菌体が破壊されていたり、不良環境下で菌の生育状況が悪い場合などは、Ziehl-Neelsen染色は細胞壁の劣化により、染色性が著しく低下することが考えられる^[2,3]。一方で、免疫組織化学染色は抗原物質がわずかでも存在していれば陽性反応を示すと考えられ、細胞壁がある程度破壊されても表面の特異抗原が存在していれば、染色性はある程度保たれると考えられる。

ヨーネ病の病理組織検査において、胎子検査などヨーネ菌が少ない検体の場合、感染評価として臓器乳剤を用いたqPCRによるヨーネ菌DNAの検出を用いることがある^[12]。しかしながらqPCRは遺伝子の検出と定量を行う方法であり、抗原が存在する組織分布は評価できないため、局在性や感染細胞を確認するためには病理組織検査が重要となる。抗*Mycobacterium bovis*抗体は他の抗酸菌とも交差性を示すため^[5]、qPCRや培養検査により陽性反応を示した菌がヨーネ菌であることの証明が必要であるが、免疫組織化学染色は抗原分布や感染細胞を確認する上で非常に有用性が高い検査法である。

以上より、ヨーネ病の病理組織検査において抗*Mycobacterium bovis*抗体を用いた免疫組織化学染色は、Ziehl-Neelsen染色より感度が高く、特にヨーネ菌の少ない組織では感度の高い検査を行うことができるため、Ziehl-Neelsen染色では明らかにできなかった組織中ヨーネ菌抗原の分布と感染細胞の確認が可能となることが期待される。

引用文献

- [1] Chiodini RJ, Van Kruiningen HJ, Merkal RS: Ruminant paratuberculosis (Johne's disease); the current status and future prospects, *Cornell Vet*, 74, 218-62 (1984)
- [2] Fukunaga H, Murakami T, Gondo T, Sugi K, Ishihara T: Sensitivity of acid-fast staining for *Mycobacterium tuberculosis* in formalin-fixed tissue, *Am J Respir Crit Care Med*, 166, 994-997 (2002)
- [3] Kanai K: The staining properties of isolated mycobacterial cellular components as revealed by the Ziehl-Neelsen procedure, *Am Rev Respir Dis*, 85, 442-443 (1962)
- [4] Gutierrez Cancela MM, Garcia Marin JF: Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions, *J Comp Pathol*, 109, 361-370 (1993)
- [5] Brees DJ, Reimer SB, Chevillat NF, Florance A, Thoen CO: Immunohistochemical detection of *Mycobacterium Paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections, *J Vet Diagn Invest*, 12, 60-63 (2000)
- [6] Verin R, Perroni M, Rossi G, De Grossi L, Botta R, De Sanctis B, Rocca S, Cubeddu T, Crosby-Durrani H, Taccini E: Paratuberculosis in sheep; histochemical, immunohistochemical and *in situ* hybridization evidence of *in utero* and milk transmission, *Res Vet Sci*, 106, 173-179 (2016)
- [7] Gonzalez J, Geijo MV, Garcia-Pariente C, Verna A, Corpa JM, Reyes LE, Ferreras MC, Juste RA, Garcia Marin JF, Perez V: Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle, *J Comp Pathol*, 133, 184-196 (2005)
- [8] 農研機構 動衛研: ヨーネ病検査マニュアル (オンライン)、(http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niah/disease/files/NIAH_yone_kensahou_180201.pdf)、(参照2018-02-01)
- [9] Rasband WS: ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, (Online), (<https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2018.) (accessed 2020, 04, 10)
- [10] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW: NIH Image to ImageJ; 25 years of image analysis, *Nature Methods*, 9, 671-675 (2012)
- [11] Abramoff MD, Magalhaes PJ, Ram SJ: Image processing with ImageJ, *Biophotonics Int*, 11, 36-42 (2004)
- [12] 矢島りさ、曾地雄一郎、西 清志: 黒毛和種におけるヨーネ菌の胎児感染、*日獣会誌*、68、167-172 (2015)