

【短 報】 公衆衛生

と畜検査において発見された牛の非定型抗酸菌症の1例

中釜 尚人¹⁾ 廣川 和郎¹⁾ 鈴木 竹彦¹⁾
成澤 昭徳²⁾ 大野 祐太³⁾ 池田 徹也³⁾

1) 北海道帯広食肉衛生検査所 (〒080-2465 帯広市西25条北2丁目1番地)

2) 北海道名寄保健所 (〒096-0005 名寄市東5条南3丁目63番地)

3) 北海道立衛生研究所 (〒060-0819 札幌市北区北19条西12丁目)

要 約

北海道帯広食肉衛生検査所が所管すると畜場において牛の非定型抗酸菌症の症例があった。当該牛は生体所見として元気消失および頭部下垂がみられ、複数の臓器およびリンパ節に乾酪壊死を伴う類上皮細胞性肉芽腫病変およびチールネルゼン染色陽性短桿菌を認めた。臓器材料からの *Mycobacteria Growth Indicator Tube* (MGIT) 法による選択増菌および抗酸菌遺伝子の解読により、*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* による非定型抗酸菌症であると判定された。豚と同様、牛においても非定型抗酸菌の全身感染を呈することが確認された。

キーワード：牛、と畜検査、非定型抗酸菌症、*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*、全身感染

-----北獣会誌 67, 147~152 (2023)

非定型抗酸菌は結核菌、らい菌およびヨーネ菌を除く抗酸菌を指し、ヒトおよび動物ならびに環境中から分離される^[1]。豚の非定型抗酸菌症は主に *Mycobacterium avium* による慢性感染症であり、肉芽腫性病変が下顎リンパ節および腸間膜リンパ節に好発するが、無症状であることが多い。本症はと畜検査において散見され、北海道帯広食肉衛生検査所(当所)所管と畜場においては、一部廃棄が平成30年~令和3年において約0.02%発生している。一方、牛における非定型抗酸菌症の症例、特にと畜検査において発見された症例報告は極めて少ない。今般、当所が所管すると畜場に搬入された牛において、非定型抗酸菌の感染により全身に病変を認めた症例があったので報告する。

症 例

当該牛は、令和2年8月、当所所管と畜場に1頭口で搬入され、当日と殺された去勢13カ月齢の黒毛和種である。と畜検査において、以下の所見を認めた。

(1) 生体検査所見：元気消失し、頭部下垂がみられた。

(2) 解体後検査所見：右肺後葉に直径約2cmの膿瘍および拇指頭大の乾酪結節を認めた(図1)。頭部においても両頬に長径約10cmの乾酪結節を認めた(図2)。肝臓および腎臓において針頭大不整形の乳白色斑を認め、肝臓の辺縁部においては直径約1cmの白色結節を1個認めた(図3)。脾臓は著しく腫大し、針頭大の乳白色



図1. 肺の乾酪結節(矢印)

連絡責任者：中釜 尚人 北海道帯広食肉衛生検査所
〒080-2465 帯広市西25条北2丁目1番地
TEL 0155-37-5168 E-mail: nakagama.naoto@pref.hokkaido.lg.jp

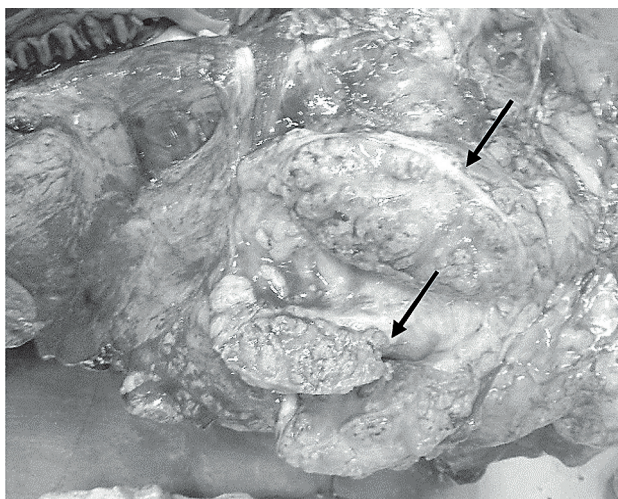


図2. 頭部の乾酪結節 (矢印)



図5. 腫大した縦隔リンパ節の乾酪壊死

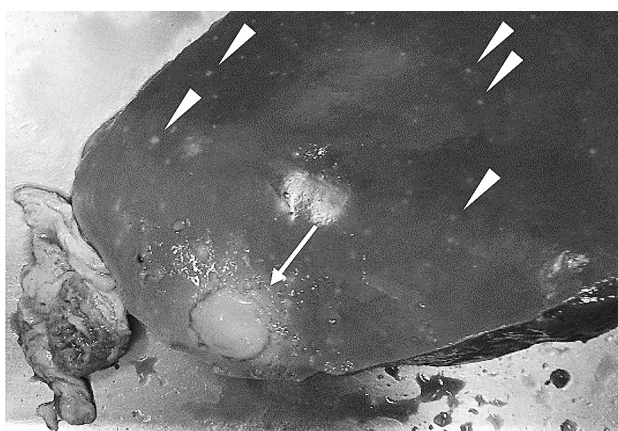


図3. 肝臓の針頭大乳白色斑 (矢頭) および白色結節 (矢印)

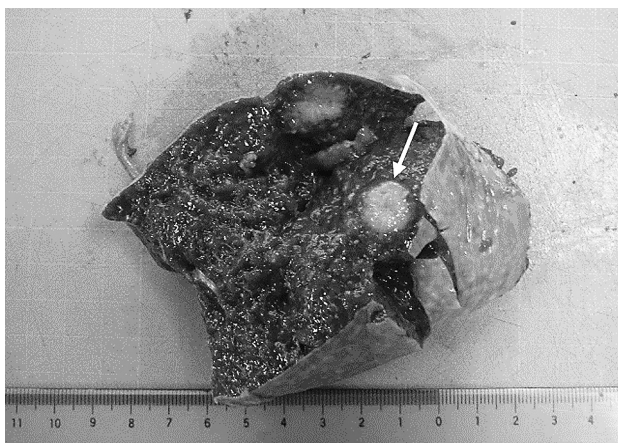


図4. 脾臓の白色結節 (矢印)

斑を認めた。脾臓は脾材および濾胞が不明瞭であり、実質内には直径約1 cmの白黄褐色調、硬結感のある白色結節を1個認めた(図4)。リンパ節(縦隔、肝門、腸間膜、下顎および内腸骨)は最大で長径約15 cmに腫大し、断面は乾酪壊死していた(図5)。

材料および方法

当該牛の主要五臓器(心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓)およびリンパ節(縦隔、下顎、腸間膜、内腸骨、肝門)を材料として、以下の検査を行った。

(1) 病理組織学的検査

各臓器およびリンパ節をホルマリン固定後、定法によりHEおよびチールネルゼン染色による組織標本を作製し、鏡検した。

(2) 微生物学的検査および分子生物学的検査

臓器およびリンパ節(材料)を各約1 g採取後、緩衝ペプトン水2 ml中で細断し、液層よりDNeasy(QIAGEN, Netherlands)のグラム陽性菌抽出プロトコルを用いてDNAを抽出後、抗酸菌16S rRNAを標的としたnested PCRにより遺伝子を検出し、サンガー法により塩基配列の解読^[2]を行った(表1)。さらに、Mycobacteria Growth Indicator Tube(MGIT:日本BD、東京)法による各材料からの抗酸菌の選択増菌を試みた。具体的には、BBL MycoPrep抗酸菌前処理キット(日本BD)により前処理したものをMGIT培地に接種し、2週間選択培地培養後、培養液を遠心分離して得た沈渣よりDNeasyを用いてDNAを抽出し、抗酸菌*rpoB*遺伝子を標的としたPCRにより遺伝子を検出し、サンガー法により塩基配列の解読^[3](表1)を行った。この時点で*rpoB*遺伝子が検出されなかったものは6週間まで培養を行い、同様に*rpoB*遺伝子の検出を試みた。ここで得た*rpoB*遺伝子の塩基配列から、BLAST検索を用いて、距離法により系統樹を作成することで、菌種を決定した。

表 1. 使用したプライマー一覧

プライマー名	塩基配列	標的遺伝子用途
Mycobacterium-1 stF	5' TGCACACAGGCCACAAGGGA 3'	抗酸菌16S rRNA 遺伝子の検出 (First PCR)
Mycobacterium-1 stR	5' GAGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'	
Mycobacterium-NF	5' CTTAACACATGCAAGTCGAAC 3'	抗酸菌16S rRNA 遺伝子の検出 (Second PCR)
Mycobacterium-NR	5' TTTCACGAACAACGCGACAA 3'	
Mycobacterium-seqF	5' CCCACTGCTGCCTCCCGTAG 3'	抗酸菌16S rRNA 塩基配列の解読
Myco-F	5' GGCAAGGTCACCCCGAAGGG 3'	<i>rpoB</i> 遺伝子の遺伝子検出 (PCR) および塩基配列の解読
Myco-R	5' AGCGGCTGCTGGGTGATCATC 3'	

結 果

(1) 病理組織学的検査

HE染色により、肺、肝臓、腎臓、脾臓、リンパ節(縦隔、肝門、腸間膜、下顎、内腸骨)においてラングハンス型巨細胞の出現を伴う類上皮細胞性肉芽腫病変を認め、その一部は中心部の壊死および石灰化を伴っていた(図

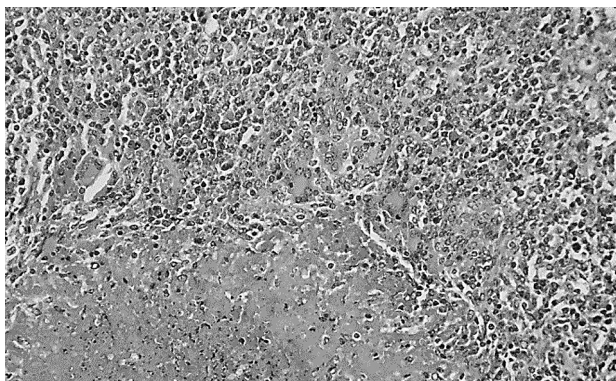


図 6. 中心部に壊死を伴う類上皮細胞性肉芽腫
脾臓、HE染色、×200

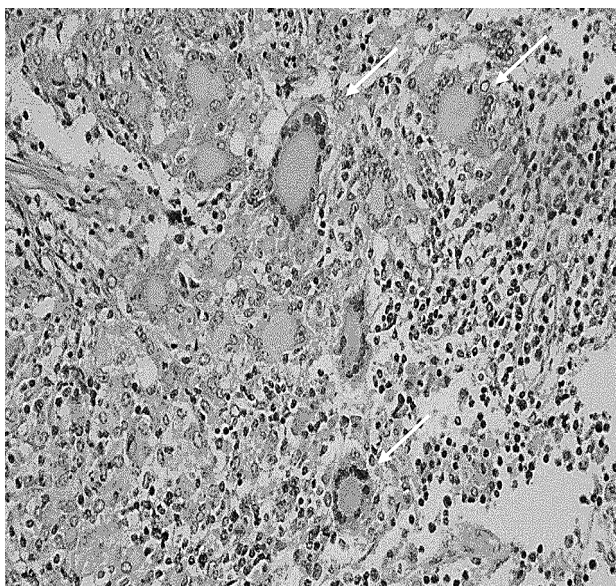


図 7. 内腸骨リンパ節
HE染色、×200 (矢印: ラングハンス型巨細胞)

6、7)。肺、肝臓、脾臓、リンパ節(肝門、腸間膜、下顎、内腸骨)では、巨細胞内にチールネルゼン染色で陽性を示す短桿菌を認めた(図8)。

(2) 微生物学的検査および分子生物学的検査(表2)

臓器由来DNAの16S rRNAの塩基配列解読の結果、肝臓および腎臓を除く臓器およびリンパ節から *Mycobacterium avium* または *Mycobacterium neoaurum* (*M. neoaurum*) の2種類の抗酸菌が検出された。MGIT培地による2週間の選択培地培養後の結果では、肺、腎臓、リンパ節(肝門、腸間膜、下顎、内腸骨)由来材料において抗酸菌 *rpoB* 遺伝子が検出され、これらの塩基配列は全て一致した。この *rpoB* 遺伝子の塩基配列についてBLAST検索を行ったところ、*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) の *rpoB* 遺伝子の配列と100%一致し、系統樹上において本菌株はMAHのクラスターに含まれた(図9)。さらに、6週間培養後の肝臓由来材料においても *rpoB* 遺伝子が検出され、2週間培養後において検出された遺伝子と配列が一致した。これらの結果より、本症例から検出された抗酸菌はMAHと同定された。

考 察

本症例では、病理組織学的検査により、複数の臓器およびリンパ節に類上皮細胞性肉芽腫および抗酸菌の存在

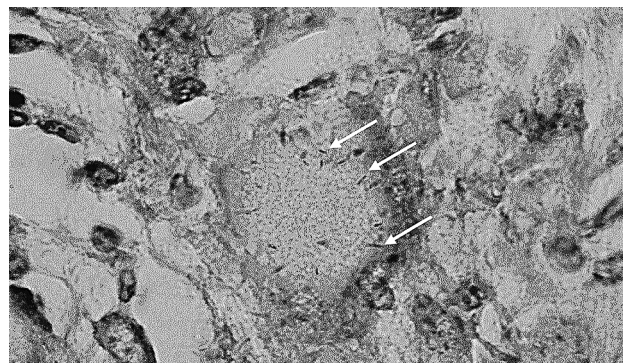


図 8. 内腸骨リンパ節
チールネルゼン染色、×400 (矢印: 抗酸菌)

表 2. 五大臓器およびリンパ節の組織病変と16S rRNA および *rpoB* 遺伝子解析による抗酸菌の検出

検体	組織病変		16S rRNA 配列	MGIT 2 週間増菌後 <i>rpoB</i>	
	肉芽腫	抗酸菌		PCR	配列
心臓	-	-	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	-	-
肝臓	+	+	-	+	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> *
肺	+	+	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	+	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
腎臓	+	-	<i>Rhodococcus</i> sp.	+	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
脾臓	+	+	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	-	-
縦隔リンパ節 1	+	-	<i>Mycobacterium avium</i>	-	-
縦隔リンパ節 2	+	-	<i>Mycobacterium avium</i>	-	-
肝門リンパ節	+	+	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	+	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
腸間膜リンパ節	+	+	<i>Mycobacterium avium</i>	+	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
下顎リンパ節	+	+	<i>Mycobacterium neoaurum</i>	+	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>
内腸骨リンパ節	+	+	<i>Mycobacterium avium</i>	+	<i>M. avium</i> subsp. <i>hominissuis</i>

*MGIT 培地で 6 週間培養後に PCR による *rpoB* 遺伝子の検出およびサンガー法による塩基配列の解析を行った。

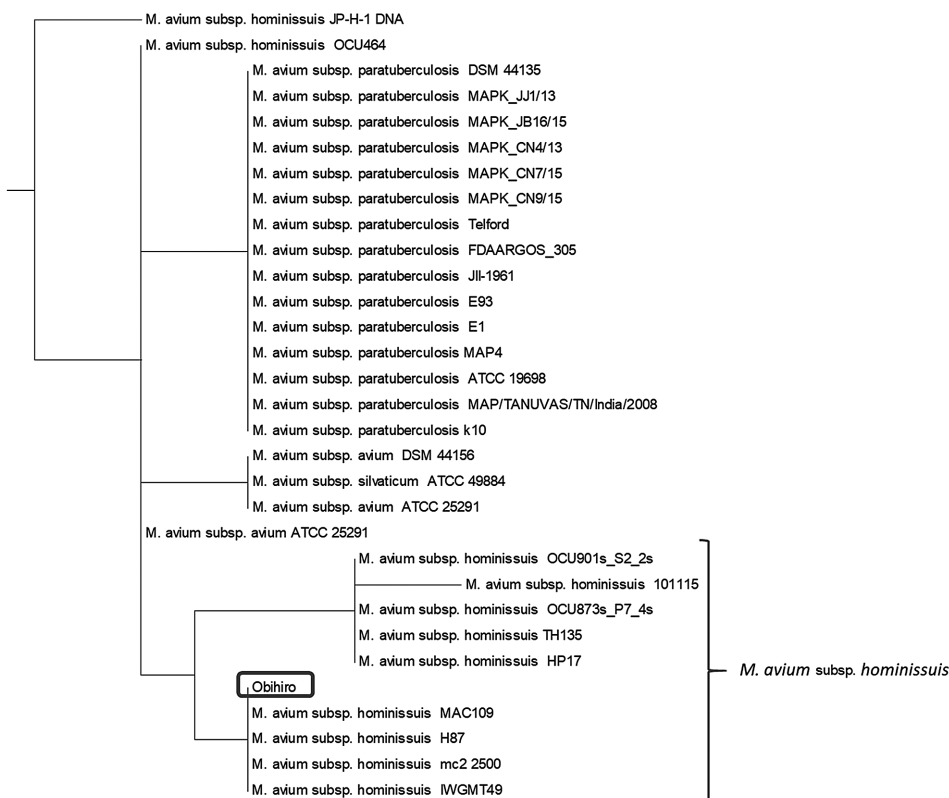


図 9. 抗酸菌 *rpoB* 遺伝子の塩基配列に基づいた系統樹
本症例のサンプルは Obihiro 株 (四角囲み)

を認めた。また、臓器由来 DNA の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の解析により、本症例は少なくとも 2 種類の抗酸菌 (MAH および *M. neoaurum*) 感染が示された。MAH による牛の非定型抗酸菌症は過去に報告例があるが [4,5]、その一方で *M. neoaurum* は健康牛から検出された例 [6] はあるものの、病原菌として分離された報告はない。さらに、MGIT 培地による選択増菌培養および *rpoB* 遺伝子の解析結果は MAH の存在を示した。これらのことから、本症例は MAH を原因菌とする牛の非定型抗酸菌症

であると診断した。

抗酸菌遺伝子の解析結果について、一部の臓器およびリンパ節において、16S rRNA と *rpoB* 遺伝子の解析結果が一致しない。このことは、臓器由来 DNA では両菌種の菌量の多寡が臓器毎の結果に反映された一方で、MGIT 培地による培養液では MAH が選択的に増菌されていたために、*rpoB* 遺伝子陽性となったすべての臓器およびリンパ節において MAH であると判定されたものと推察された。

MAHは鳥型結核菌群 (*Mycobacterium avium* complex : MAC) を構成する抗酸菌の一種である。本菌は豚およびその飼養環境から分離され、豚の非定型抗酸菌症の主要な原因菌である^[8,9]。豚における本症は、と畜検査における一部または全部廃棄処分の対象疾病であり、生体時に臨床症状を示すことはほとんどないが、解体後にリンパ節および臓器に結節性病変を認めることにより、と畜検査で発見されることが多い。牛の非定型抗酸菌症も豚の場合と同様、生体時は無症状であることが多いとされており^[10]、解体後検査においても多臓器に病変を認めた報告は少ない^[4]。今回遭遇した症例は、生体所見として元気消失および頭部下垂がみられ、かつ複数の臓器およびリンパ節に病変を認めたことから、牛においても豚の場合と同様に非定型抗酸菌による全身感染を呈することが確認された希少な症例と考える。

MAHを含むMACは、過敏性または感染性の肺炎の原因であるが、その感染経路は経気道感染と考えられている^[11,12]。しかし、免疫不全患者において全身感染を起こす播種性MAC症は、経口感染による日和見感染症とされ^[11,13]、食品のMAC汚染が食品衛生上問題となる。MACの食肉等を介したヒトへの感染報告はこれまでないが、牛および豚由来の生肉や肉製品からMAHの遺伝子が検出されており^[14]、MAH感染豚の糞便からMAHを分離した報告^[15]や牛糞便中から多種類の*Mycobacterium*属菌を検出した報告^[6]があることから、食肉等が感染原因となる可能性が危惧される。よって、非定型抗酸菌症をと畜検査で確実に排除することは、食肉の安全安心に欠かせない。

牛の非定型抗酸菌症は非常に珍しく、今回肉眼・組織所見や精密検査の方法など、と畜検査を行う上で貴重な情報を得ることができた。本症は肉眼的および病理組織学的に結核病と類似していることから、と畜検査員は類似症例がと畜検査において発見された際に備え、その対応や必要な精密検査などについて想定しておく必要がある。

引用文献

- [1] 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、57-66 (2006)
- [2] Andenmatten S, Opota O, Jesica M, Laurent N, Greub G, Jatou K: Added diagnostic value of 16S rRNA gene pan-mycobacterial PCR for nontuberculous mycobacterial infections; a 10-year retrospective study, *Eur J Clin Microbiol*, 38, 1873-1881 (2019)
- [3] Iskandar BS, Toidi A, Didier R, Michel D: *rpoB* sequence-based identification of *Mycobacterium avium* complex species, *Microbiology*, 154, 3715-3723 (2008)
- [4] Komatsu T, Inaba N, Kondo K, Nagata R, Kawaji S, Shibahara T: Systemic mycobacteriosis caused by '*Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*' in a 14-month-old Japanese black beef steer, *J Vet Med Sci* 79, 1384-1388 (2017)
- [5] 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)
- [6] Leah P, Nyasha C, Marcelyn M, Joshua M, Vurayai R, Pasipanodya N: Molecular identification of *Mycobacterium* species of public health importance in cattle in Zimbabwe by 16S rRNA gene sequencing, *Open Microbiol J*, 9, 38-42 (2015)
- [7] Möbius P, Lentzsch P, Moser I, Naumann L, Martin G, Kohlen H: Comparative macro-restriction and RFLP analysis of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* isolates from man, pig and cattle, *Vet Microbiol*, 117, 284-291 (2006)
- [8] Wellenberg GJ, de Haas PEW, van Ingen J, van Soolingen D, Visser IJR.: Multiple strains of *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis* infections associated with aborted fetuses and wasting in pigs, *Vet Rec*, 167, 451-454 (2010)
- [9] 小松徹也、高村祐士、稲葉七巳、渡戸英里、杉江建之介、山本陽子：新規の分子遺伝学的特徴を持つ*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*による豚抗酸菌症の集団発生、日獣会誌、75、e56-e61 (2022)
- [10] 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)
- [11] 日比谷健司、比嘉 太、健山正男、藤田次郎：人獣共通感染症としての抗酸菌症—特に*Mycobacterium avium* complex 症の比較病理—、結核、82、539-550 (2007)
- [12] Embil J, Warren P, Yakrus M, Stark R, Corne S, Forrest D, Hershfield E: Pulmonary illness associated with exposure to *Mycobacterium-avium* complex in hot tub water. Hypersensitivity pneumonitis or infection?, *Chest J*, 111, 813-816 (1997)
- [13] Inderlied CB, Kemper CA, Bermudez LEM: The

-
- Mycobacterium avium* complex, Clin Microbiol Rev, 6, 266-310 (1993)
- [14] Klanicova B, Slana I, Vondruskova H, Kaevska M, Pavlik I: Real-time PCR detection of *Mycobacterium avium* subspecies in meat products, J Food Protect, 74, 636-640 (2011)
- [15] Agdestein A, Olsen I, Jørgensen A, Djønne B, Johansen TB: Novel insights into transmission routes of *Mycobacterium avium* in pigs and possible implications for human health, Vet Res, 45:46 DOI: 10.1186/1297-9716-45-46 (2014)