

## 4 牛のヨーネ病抗体非特異反応多発農場で分離された抗酸菌の性状解析

県北家畜保健衛生所

加藤貴誉湖、湯澤裕史

### はじめに

抗酸菌は、環境中に広く存在し、日和見的に乳房炎等を引き起こすことが知られている<sup>1)</sup>。また、ヨーネ病抗体検査で非特異反応を引き起こす一因が環境中の抗酸菌とされており、平成 22 年度以降、日本各地で非特異反応が報告されている<sup>2, 3)</sup>。

平成 25 年度にヨーネ病防疫対策要領が改正され、確定検査が抗体検査から遺伝子検査に変更となり、患畜殺処分頭数は減少した。しかし、非特異反応が多い場合は、確定検査を実施する頭数が増え、家畜保健衛生所の業務が増えるだけでなく、畜主の労力的、精神的な負担も増加することから、対策が求められていた。

今回、非特異反応が多発した管内大規模農場で、環境材料及び乳汁から抗酸菌の分離を試みたところ、高率に抗酸菌が分離された。そこで、非特異反応の減少を目的として、分離菌の性状解析を行うとともに、非特異反応への関与及び石灰消毒の効果について検証したので、その概要を報告する。

### 農場概要

当該農場は、乳用牛約 800 頭を飼養する大規模農場で、主にフリーストール牛舎で飼養されている。敷料は、戻し堆肥とオガ粉を同量混和したものに、消石灰を約 1.4% 添加して使用している。なお、牛舎の配置は、図 1 に示したとおりである。

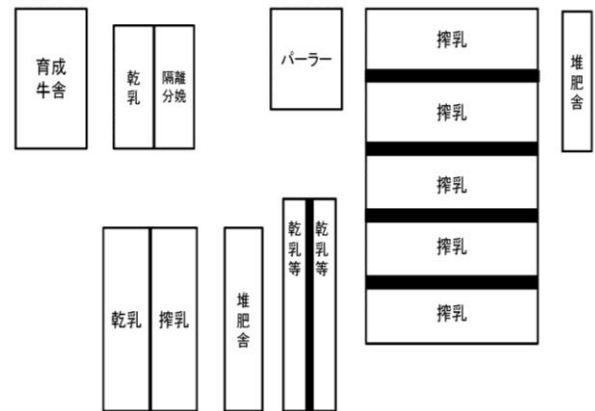


図 1 牛舎見取り図

### 経緯

当該農場は、平成 27 年度の家畜伝染病予防法第 5 条（法第 5 条）に基づくヨーネ病検査において、783 頭中 55 頭が、スクリーニング検査（抗体検査）で陽性となり、リアルタイム PCR 検査（rPCR）による確定検査を行ったところ、全頭陰性となった。

### 材料及び方法

#### 1 抗酸菌の分離・同定

環境材料として、敷料 33 検体、オガ粉、飼料、完熟堆肥各 1 検体及び乳汁 21 検体を供試した。環境材料は、ヨーネ菌培養法に準じて前処理し、0.75%ヘキサデシルピリジニウムクロライド処理のみ 37°C4 時間とした。乳汁は、3,000rpm、10 分間遠心後、沈渣を PBS500  $\mu$ l で懸濁して供試した。

前処理した各材料は、それぞれ 2 本の 2% 小川 PS 培地に接種し、37°C で 1~4 週間培養した。発育した菌は、抗酸菌用平板培地であ

る Middlebrook7H10agar で 37℃、約 4 日間、純培養を行った。純培養後、InstaGeneMatrix を用いて遺伝子を抽出し、抽出産物について、抗酸菌の共通遺伝子領域である *hsp65* 遺伝子を標的とした PCR 法により、同定を行った。

## 2 分離菌の遺伝子的分類

制限酵素切断パターンによる分類は、同定時に用いた分離菌の PCR 増幅産物を、2 種類の DNA 制限酵素である BstP I 及び HaeIII で切断して行った。反応条件は、BstP I が 60℃、HaeIII が 37℃で 1 時間とした<sup>4)</sup>。

rPCR による分類は、7 つのプライマーを用いて rPCR を実施し、融解曲線のピーク時の温度 (T<sub>m</sub> 値) の違いにより行った。T<sub>m</sub> 値が 75~80℃を結核菌群 (MTC)、80~85℃と 85~90℃を鳥型結核菌群 (MAC)、80~85℃を結核菌群と鳥型結核菌群以外の抗酸菌群 (AFB) に分類した<sup>5)</sup>。

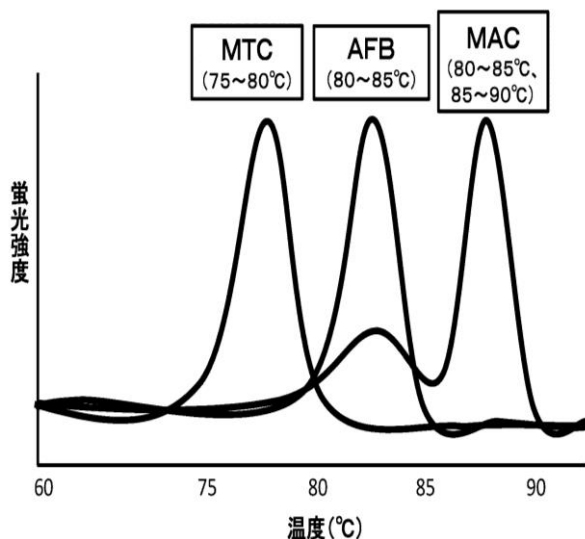


図 2 rPCR 模式図

## 3 ELISA 吸収試験

供試血清は、平成 27 年度の法 5 条におけるヨーネ病抗体検査時に陽性だった血清 18 検

体とし、56℃、30 分間非働化した。吸収試験用の菌体は、切断パターンで多数を占めた 3 パターンから各 1 株を供試し、菌体を 10% になるように PBS に懸濁し、75℃、15 分間加熱して不活化処理し、死菌液とした。吸収処理は、死菌液を血清に 10mg/ml になるように加え、4℃で一晩感作させた後、15,000rpm、5 分間遠心し、上清 5  $\mu$ l を用いて、定法に従いヨーネライザ KS を実施した<sup>6)</sup>。

## 4 石灰消毒の効果検証

ELISA 吸収試験に用いた 3 株を供試した。石灰との感作は、滅菌したオガ粉と堆肥の混合物 (等量混合) 3g に菌液 1ml 及び消石灰を 1、1.5、2、3、4 及び 5% の各濃度になるように加え、転倒混和後、37℃、24 時間静置して行った。感作した混合物に、生理食塩水 30ml を加え、1,960rpm、30 分間遠心後、上清を除去し、沈渣に 1ml の抗生物質カクテル (バンコマイシン 50  $\mu$ g/ml、ナリジクス酸 50  $\mu$ g/ml 及びアンホテリシン B 50  $\mu$ g/ml を 1/2 濃度の BHI 培地で作成したもの) を加えよく混和した。混和した液 100  $\mu$ l を Middlebrook7H10agar に接種し、37℃で培養後、2、3 及び 7 日目に菌の発育の有無で消毒効果を判定した。

## 結果

### 1 分離培養

抗酸菌は、11 牛舎中 8 牛舎の敷料 18 検体、堆肥 1 検体及び乳汁 7 検体から、合計 38 株分離された。分離菌は、図 3 のように 2% 小川 PS 培地上に発育した。

### 2 分離菌の遺伝子的分類

分離菌 38 株を 2 種類の制限酵素で切断したところ、BstP I で 5 パターン、HaeIII で 6 パターンに切断された (図 4)。また、2 つの制限

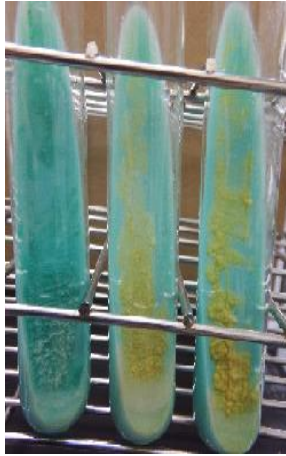


図3 2%小川PS培地上の抗酸菌

酵素の切断パターンの組み合わせにより、7つの切断パターンに分類され、切断パターン①は4株、②は10株、③は20株、④～⑦はそれぞれ1株であった(表1)。

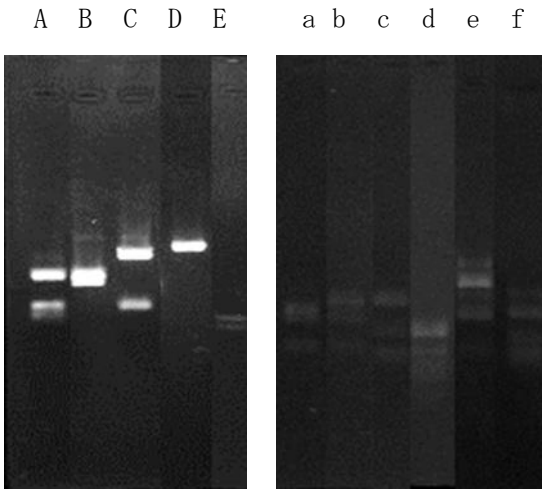


図4 制限酵素切断像

表1 切断パターン組み合わせ

切断パターン	切断像		菌株数
	BstP I	Hae III	
①	A	a	4
②	B	b	10
③	B	c	20
④	E	c	1
⑤	C	d	1
⑥	D	e	1
⑦	B	f	1

rPCRでは、38株全て融解曲線のピークが82～83℃の範囲に入り、AFBであった(図5)。

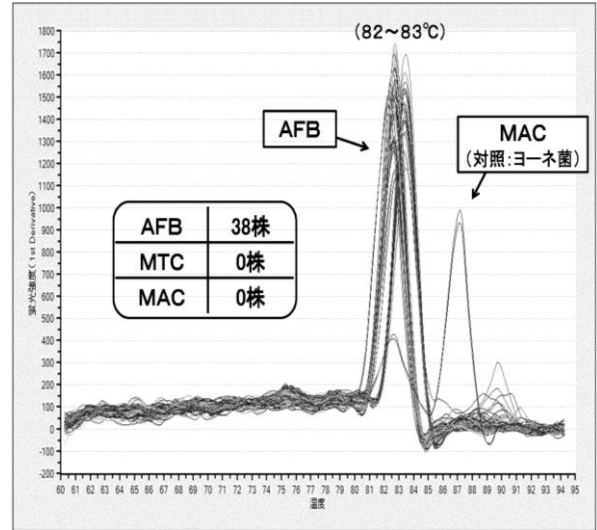


図5 rPCR結果

### 3 ELISA 吸収試験

未処理の血清と吸収後の血清のELISA値(E値)の差の範囲(最大値～最小値)及び平均値は、それぞれ、パターン①が0.70～0.05、0.32、パターン②が0.72～0.01、0.28、パターン③が0.71～0、0.22であった(図6)。

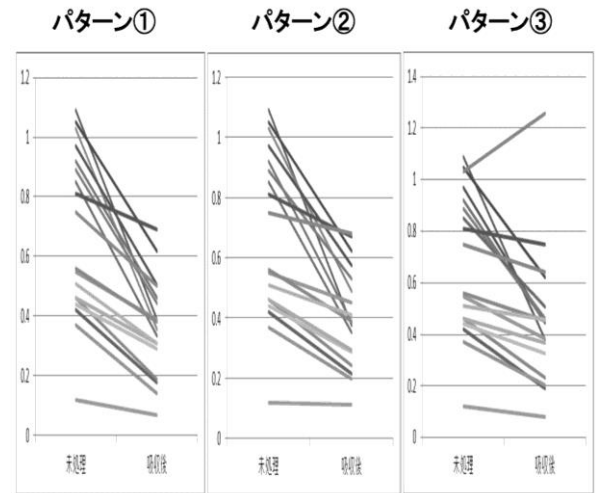


図6 吸収試験結果

### 4 石灰消毒の効果検証

3株とも、石灰濃度が高くなるほど発育までの日数が長くなる傾向がみられたが、接種

後 7 日目には、全ての濃度において菌の発育が確認された（表 2）

表 2 石灰消毒の効果検証結果

パターン	接種後 日数	石灰濃度(%)					
		1	1.5	2	3	4	5
①	2	+	+	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	-	-
	7	+	+	+	+	+	+
②	2	+	+	+	+	-	-
	3	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+
③	2	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	7	+	+	+	+	+	+

+:発育 -:発育なし

### 考察及び今後の展望

抗酸菌は、敷料 18 検体、堆肥 1 検体、乳汁 7 検体から高率に分離された。また、分離菌は、rPCR により、全て AFB に分類されたが、制限酵素による切断パターンでは、7 つに型別された。以上のことから、本農場では、複数の抗酸菌が広く浸潤していると考えられた。また、完熟堆肥から菌が分離されたことは、堆肥化が不十分である可能性が考えられた。

ELISA 吸収試験では、3 パターンの菌株で E 値の減少が認められたが、菌株間で E 値の減少に大きな差はみられなかった。通常、非特異反応の原因菌を吸収試験に用いた場合、著しく E 値が減少することから、3 菌株が、非特異反応の原因菌と断定することはできなかった。

石灰消毒の効果検証では、発育までの日数に差がみられたものの、全ての濃度において抗酸菌の発育が確認された。竹内らは、消石

灰濃度 5% で 24 時間感作させた敷料において、大腸菌群が未検出となったと報告<sup>7)</sup>していることから、消石灰の消毒効果は、一般的な細菌では 5% 程度の濃度で十分であっても、抗酸菌では低く不十分と思われた。

今後は、今回吸収試験を行わなかった他の 4 パターンの菌株についても試験を実施し、原因菌の検索を行うとともに、シーケンス等で分離菌の同定を行い、他県の分離菌と比較したい。

さらに、堆肥から抗酸菌が分離されていることから、堆肥化を完全に行うため、堆肥処理工程の見直しを行うとともに、適切な石灰濃度及び消毒方法を検証し、環境中の抗酸菌を低減させ、非特異反応が減少するように指導したい。

### 参考文献

- 1) 矢部 静ら: ヨーネ病抗体非特異反応についての新たな知見が見いだされた経緯②、臨床獣医、V o l 30、N o . 6 (2012)
- 2) 濱崎 尚樹ら: ヨーネ病抗体非特異反応についての新たな知見が見いだされた経緯①、臨床獣医、V o l 30、N o . 5 (2012)
- 3) 三好 里美ら: ヨーネ病検査結果分析から疑われた抗体非特異反応の一考察、平成 22 年度第 52 回全国家畜保健衛生業発抄録(2010)
- 4) Anne Devallois ら: Rapid Identification of Mycobacteria to Species Level by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of the *hsp65* Gene of an Algorithm To Differentiate 34 Mycobacterial Species、Jorunal of Clinical Microbiology p2969-2973 (1997)
- 5) E. T. Richardson ら: Rapid Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and

Nontuberculosis Mycobacteria by Multiplex,  
Real-time PCR、Journal of Clinical  
Microbiology p1497-1502 (2009)

6) 北海道家畜保健所作成マニュアル:ヨーネ  
(プルキエ) 非特異反応検体 吸収試験

7) 竹内智胤ら:クレブシエラ乳房炎発生酪農  
場における敷料の衛生管理対策、平成 25 年度  
第 55 回全国家畜保健衛業発抄録(2013)