

## ヨ－ネ病の診断法に関する研究

森 康行<sup>1)\*</sup>, 菊間 礼子<sup>1)</sup>, 宗田 吉広<sup>1)</sup>, 吉原 一浩<sup>1)</sup>, 彦野 弘一<sup>2)</sup>, 百溪 英一<sup>2)</sup>

(平成14年11月14日 受付)

### Studies on the diagnostic methods for bovine paratuberculosis

Yasuyuki MORI<sup>1)\*</sup>, Reiko KIKUMA<sup>1)</sup>, Yoshihiro MUNETA<sup>1)</sup>, Kazuhiro YOSHIHARA<sup>1)</sup>,  
Hirokazu HIKONO<sup>2)</sup>, Eiichi MOMOTANI<sup>2)</sup>

ヨ－ネ病診断技術の改良, 開発を目的として, 1) PCRによる糞便中ヨ－ネ菌の検出, 2) インターフェロン・ガンマ (IFN- $\gamma$ ) 検出によるヨ－ネ病の早期診断, 3) ヨ－ネ菌特異抗原及び表面抗原の解析と診断への応用, 4) ヨ－ネ菌感染における細胞性免疫応答の解析等, 様々な角度からヨ－ネ病の新たな診断法について検討した。PCR法として, internal control DNAを添加した反応系が, サンプル毎の糞便由来PCR反応阻害作用の影響を検定することが可能であり, 糞便中ヨ－ネ菌検出法として有用であった。IFN- $\gamma$  検査では, 陽性対照として設けた concanavalin A (Con A) 刺激によるIFN- $\gamma$  の産生量が, 健康牛では最も高い値を示すのに対し, ヨ－ネ病感染牛ではヨ－ニンPPD刺激時のIFN- $\gamma$  産生量が最も高い傾向が認められたことから, この点を診断上の一つの基準とすることが望ましい。ヨ－ネ菌の抗原解析において, 類似の鳥型結核菌とは反応しないヨ－ネ菌に対して特異性の高いモノクローナル抗体 (Mab) が得られた。さらに, 当該Mabはヨ－ネ菌の表面に存在するリポアラビノマンナンを認識していた。ヨ－ネ菌Alkyl hydroperoxide reductases C の遺伝子組換え体を作成し, 本組換え抗原がヨ－ネ菌実験感染牛の血液細胞からIFN- $\gamma$  の産生を誘導することを確認した。ケモカインの一つであるmonocyte chemoattractant protein-1の産生とヨ－ネ菌感染との関連がマウス感染モデル実験において示唆された。

### はじめに

ヨ－ネ病は *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (ヨ－ネ菌) によって惹起される反芻獣の慢性肉芽腫性腸炎で, 非常に長い潜伏期間を特徴とし

ている。結核やブルセラ病の発生が殆ど認められなくなった我が国において, ヨ－ネ病は家畜法定伝染病の中でも最も多発している牛疾病の一つである。現在ヨ－ネ病の防疫対策は, 「摘発淘汰」を基本として進められており, 診断法としては, ヨ－ネ菌分離, ELISAによる抗体検査, 及びヨ－ニン皮内反応が用いられている。糞便からのヨ－ネ菌分離は最も信頼性の高い診断法であるが, ヨ－ネ菌は発育速度が極めて遅く, ヨ－ネ菌培養検査の最終成績が得られるまでには, 2~4ヶ月を必要とする。ELISAによる抗体検査では, 感染早期には抗体上昇が認められない。また, ヨ－ニン皮内反応は, ヨ－ネ菌に対する宿主の細胞性免疫反応を指標とした診断法であるが, 病勢進行時に陰転することが多い<sup>12)</sup>。このように, 現行の各診断法には改良されるべき点もあり, さらなるヨ－ネ病診断技術高度化の為, ヨ－ネ菌特異抗原及び表面抗

1) 動物衛生研究所免疫研究部免疫機構研究室  
2) 動物衛生研究所企画調整部ヨ－ネ病・炎症性腸疾患研究チーム

1) Immune System Section, Department of Immunology, National Institute of Animal Health  
2) Paratuberculosis and Inflammatory Bowel Disease Research Team, Department of Planning and Coordination, National Institute of Animal Health

\* Corresponding author, Mailing address: Immune System Section, Department of Immunology, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856 Japan. Tel: 81-29-838-7857, Fax: 81-29-838-7880, E-mail:yamori@affrc.go.jp

原の解析と診断への応用, PCRによる糞便中ヨーネ菌検出法, インターフェロン・ガンマ (IFN- $\gamma$ ) 検出によるヨーネ病の細胞性免疫診断法, ヨーネ菌感染におけるケモカイン応答の解析等について検討した。

### 試験研究方法

#### 1. 供試菌株及び培地

供試菌株は表1に記載した通りである。ヨーネ菌の培養には, マイコバクチン添加ハロルド培地, あるいはマイコバクチン, グリセリン加Middlebrook 7H9培地 (OADC Enrichment添加) を用いた。 *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (鳥型結核菌) P-18株, 及び *Mycobacterium bovis* BCGの培養には, 1%小川培地を用いた。また, Purified protein derivative (PPD) の調製には, OADC Enrichment無添加のマイコバクチン, グリセリン加Middlebrook7H9培地を用いた。

#### 2. モノクローナル抗体 (Mab) の作出

定法に従い, BALB/cマウスをヨーネ菌ATCC19698株で免疫し, 脾臓細胞とP3U1細胞を用いてハイブリドーマを作出した。Mabの1次スクリーニングとして, ヨーネ菌超音波破碎抗原を用いたELISAを実施し, 2次スクリーニングには, ヨーネ菌ATCC19698株及び鳥型結核菌P-18株を用いたドットプロットングを行った。

#### 3. PCR検査法

糞便からのDNA抽出及びPCRには, (株) 島津製作所分析計測事業部ライフサイエンス研究所 (つくば) において試作されたヨーネ菌PCR検査用試薬キットを使用した。検査キットには糞便からのDNA抽出に必要な試薬類及びTaq以外のPCR反応液が含まれ, 本試薬キットを用いた糞便からのDNA抽出方法の概略は図1に示した通りである。PCRによるヨーネ菌遺伝子IS900の増幅は, 既に報告したNested PCR<sup>6)</sup>により行い, 結果は2~3%アガロースゲルを用いた電気泳動で増幅バンドのサイズを確認することにより判定した。試薬キットの1st PCR反応液には極少量のinternal control DNA (IC) が添加されている。ICとは, 1st PCRターゲット遺伝子と同様な配列を持つ遺伝子断片であり, 図2に示したように, 糞便中に本来のターゲットであるヨーネ菌DNAが存在しない場合に, ICが増幅される。本来のターゲット遺伝子とICとは増幅された時のサイズが異なるため, 電気泳動を行うことにより容易に判別可能である。

#### 4. 抗原の調製法

##### (1) PPD調製法

ヨーネ菌PPD (J-PPD) 及びツベルクリンPPD (B-PPD) は, それぞれヨーネ菌Kag-1株, 及びM. bovis

表1 供試菌株

菌種名	株名
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	ATCC19698
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	Kag-1
<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>avium</i>	P-18
<i>Mycobacterium bovis</i> BCG	Tokyo

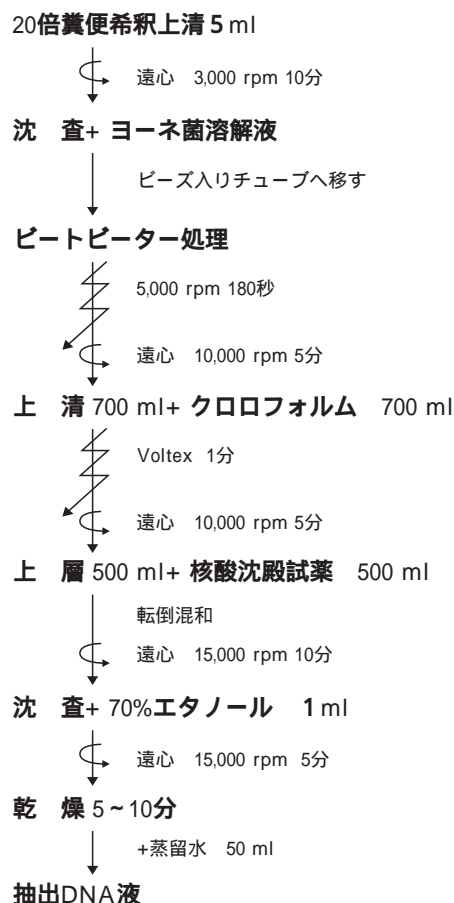


図1 ヨーネ菌PCR検査用DNA抽出法

BCGを用いて作製した。各PPDは, 動物用生物学的製剤基準「鳥型ツベルクリンPPD」の製法, 及びOIEマニュアルの鳥型結核菌PPDの製法<sup>3)</sup>に準じ調製した。

##### (2) ヨーネ菌リポアラビノマンナン (LAM) の調製

ヨーネ菌Kag-1株より, Hamasurらの方法<sup>2)</sup>に従いヨーネ菌多糖体画分を抽出, 精製し, さらに, 抗LAMモノクローナル抗体を用いたイミュノアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

##### (3) 遺伝子組換え型ヨーネ菌Alkyl hydroperoxide reductases C (ahp-C) の作出

データベース上に登録されたヨーネ菌ahp-Cの遺伝子

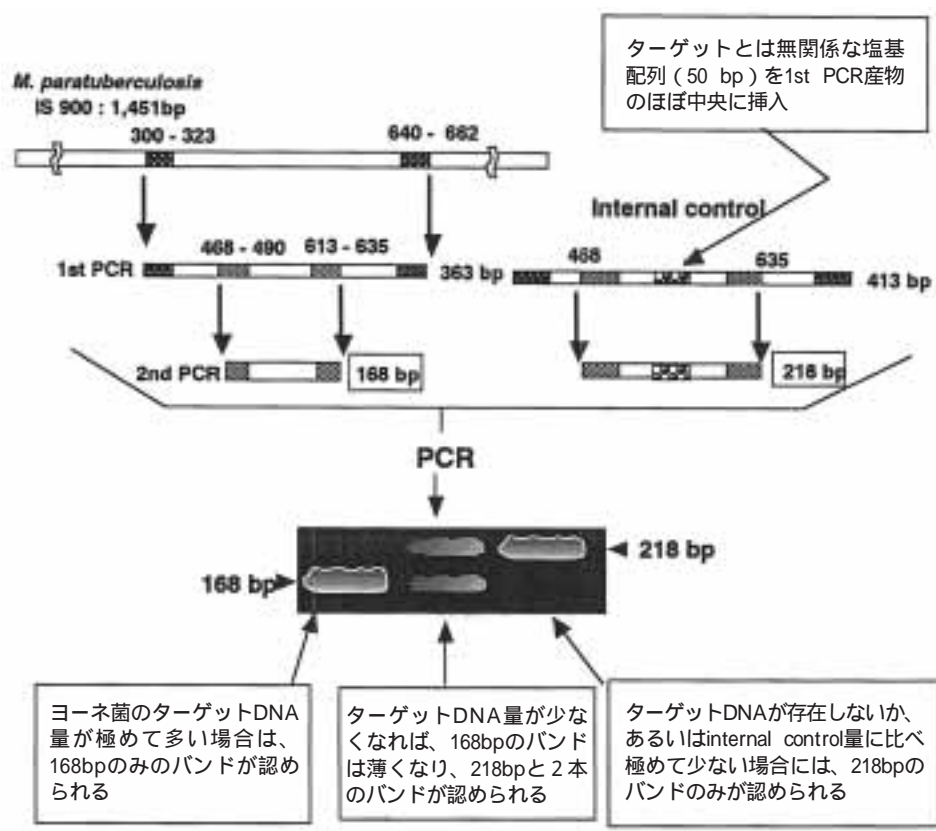


図2 Internal control PCR

配列を基に、アミノ酸コード配列 (CDS) を増幅するためのPCR用プライマーを設計した。ヨーネ菌 ATCC19698株より調製したDNAを鋳型としてCDSをPCRにより増幅し、増幅断片をN末、及びC末それぞれにヒスチジン・タグ (His-tag) が付加された組換え蛋白が発現されるように、2種のプラスミドベクター (pQE30, 70) に挿入した。作出された組換えプラスミドベクター (N末His-tag付加用; pQE/ahpC-N-His, C末His-tag付加用; pQE/ahpC-C-His) を大腸菌にトランスフォームし、当該ベクターを含む大腸菌を大量培養して、遺伝子組換え型ahp-Cを作製した。組換え蛋白の精製には、ニッケル・アフィニティーカラム法を用いた。

5. IFN- 検査法

IFN- 産生の特異性を調べる為にJ-PPDに加え、B-PPDによる刺激を行い、さらにIFN- 産生の陽性コントロールとしてconcanavalin A (Con A) を添加する系を設けた。図3.に示したIFN- 検査の術式に従い、ヘパリン加牛末梢血に、J-PPD (1 µg/ml), B-PPD (1 µg/ml) 及びCon A (10 µg/ml) を添加し、24時間培養後の上清中IFN- 濃度を測定した。培養後の上清中IFN- 濃度は、抗牛IFN- モノクローナル抗体

(Serotec社製) とビオチン標識抗牛IFN- ポリクローナル抗体を用いたELISAダブルサンドイッチ法により、遺伝子組換え型牛IFN- を標準品として測定した。

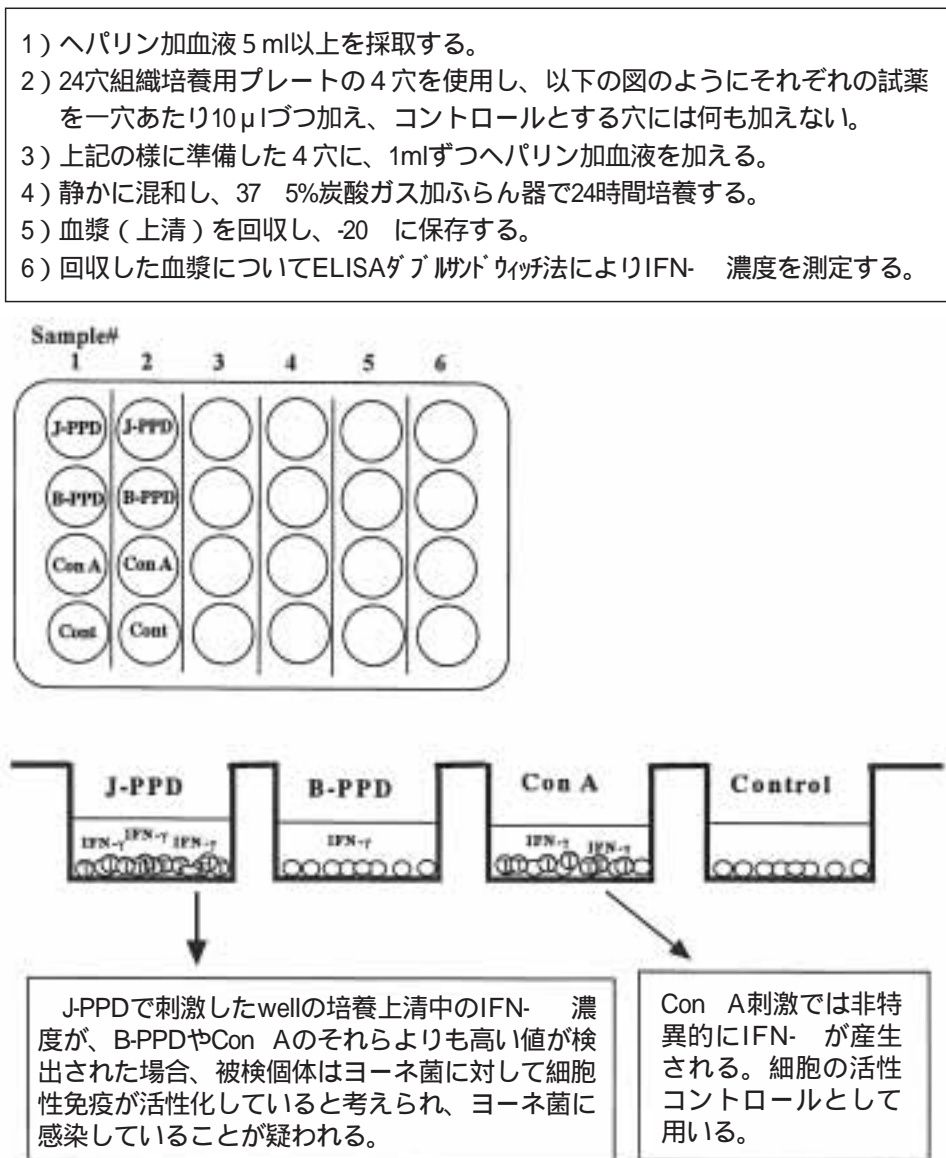
6. ヨーネ菌動物接種試験

1) マウスを用いた接種試験

C57BL/6マウスはヨーネ菌感受性であることからこれを用いた。また、これまでの実験でヨーネ菌感染においてヨーネ菌に感染し、かつ病変への単球マクロファージ系 (MPS系) 細胞の顕著な病変を形成する腫瘍壊死因子- 遺伝子欠損 (TNFα-Ko) マウスでの検討も行った。Middlebrook 7H9で培養されたヨーネ菌 (ATCC 19698) 2.8x10<sup>7</sup> CFU/mlを腹腔内接種後、4, 7, 21, 42日目に安楽死し、肝臓及び脾臓を-80 に保存した。

2) 牛を用いた感染試験

ヨーネ病発生歴のない酪農家より、生後5日~1週令の5頭のホルスタイン雄子牛を導入し、実験に供した。実験感染には、ヨーネ病を発症した野外牛の腸管乳剤を0.75%Hexadecylpyridinium Chlorideを含むBrain heart infusion培地で作製し、37 に一夜静置した後、1頭当たり25mlの乳剤を人工乳と共に経口的に、3日間連続投与した。投与乳剤中のヨーネ菌量は、6.9x10<sup>8</sup>

図3 IFN- $\gamma$  検査法

CFU/mlである。

#### 7. サイトカインRT-PCR

マウスを用いた実験では、全実験期間の各臓器サンプル収集後にトリゾールによりtotal RNAを抽出し、特異的なプライマーを用いたRT-PCR法により2種のケモカイン、monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) および regulated on activation normal T-cell expressed and secreted (RANTES) のmRNA発現量を半定量し、比較を行った。牛を用いた実験では、牛MCP-1のmRNA発現解析用RT-PCRの系について、ヨーネ病実験感染牛と非感染牛の末梢血単核細胞を用いて、種々のプライマーを設計し検討した。

#### 8. PCR並びにIFN- $\gamma$ 検査の野外牛への応用

今回開発されたPCR検査及びIFN- $\gamma$  検査を、平成13年度診断予防技術向上対策事業(ヨーネ病)において、野外の牛に試験的に実施した。実施農場数は118農場、検査頭数は1,329頭である。PCRは、ヨーネ菌PCR検査用試薬キットを各県家畜保健衛生所に供給し、検査を実施した。IFN- $\gamma$  検査については、PPD類を各県に供給し、血液の培養は各県で行い、回収された上清について動物衛生研究所でIFN- $\gamma$  ELISAを実施した。

##### 試験研究成績の概要

#### 1. PCRによるヨーネ菌検出

糞便中には様々な微生物が存在すると同時に、多量の

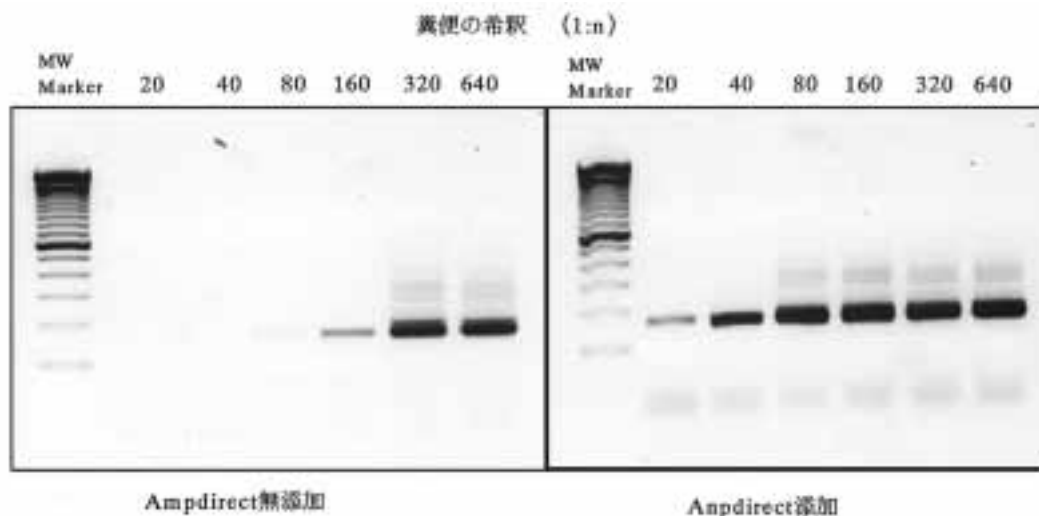


図4 Ampdirectによる糞便のPCR阻害作用の抑制  
 ヨーネ菌感染牛の糞便を1:20~1:640まで希釈しPCRを行った。AmpdirectをPCR反応系に加えることにより、糞便の低い希釈においてもPCRが陽性となる。

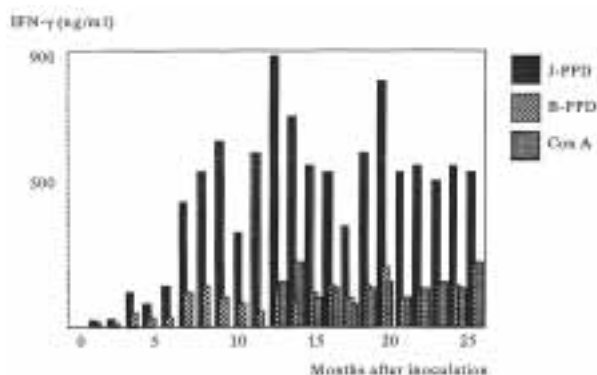


図5 ヨーネ菌実験感染牛 (Animal #31) の IFN- 応答

タンパク質や多糖体が存在しPCR反応を阻害することが知られている。糞便からDNAを抽出しPCR用のテンプレートDNAとして用いる場合、抽出液の中に含まれるPCR阻害物質の作用を抑制して偽陰性となることを防ぐことが重要な点となる。今回用いたPCR反応液には、Ampdirect<sup>®</sup> (島津製作所) が添加されている。この試薬は、血液由来PCR阻害物質の作用を抑制する試薬として市販されているが、牛糞便由来物質によるPCR阻害作用も大幅に軽減できることが明らかとなった (図4)。さらに、各糞便サンプルのPCR阻害作用の強弱をPCR反応と同時に検出する為に、ICを含むPCR法 (IC-PCR) を実施した。このようなIC-PCR系を組むことにより、ヨーネ菌DNAが糞便中に存在するにも拘わらず、糞便由

来のPCR反応阻害物質のためにPCRが陰性となる偽陰性の結果を防ぐことが可能となる。今回開発されたPCR法を、平成13年度診断予防技術向上対策事業において検査された1,329頭について実施したところ、ヨーネ菌分離陽性となった牛が9頭であったのに対し、PCR検査陽性は81頭に上り、本法が極めて効率よく糞便中ヨーネ菌DNAを検出可能であることが示唆された。

## 2. IFN- 検査による早期診断

種々のIFN- に対するモノクローナル抗体及びポリクローナル抗体を用いてELISAダブルサンドイッチ法について検討した結果、抗牛IFN- モノクローナル抗体 (Serotec社製) とビオチン標識抗牛IFN- ポリクローナル抗体を用いたELISAにより、100 pg/mlの濃度まで培養上清中のIFN- が検出可能であった。IFN- 検査を行うに当たって、IFN- 産生の特異性を調べる為にJ-PPDに加えB-PPDによる刺激を行い、さらにIFN- 産生の陽性コントロールとしてCon Aを添加する系を設けた。ヨーネ菌実験感染牛について経時的にIFN- 検査を行ったところ、ヨーネ菌経口接種後1ヶ月前後でIFN- 応答が検出され、接種後2年以上を経過しても、IFN- 産生能を検出できることが明らかとなった (図5)。さらに、非感染牛ではCon Aに対するIFN- 産生応答が最も高値を示したのに対し、ヨーネ菌感染牛ではCon Aに対するIFN- 産生量は、J-PPDのそれよりも低い傾向を示した (表2)。IFN- 検査について、平成13年度診断予防技術向上対策事業において野外の牛に実施したところ、ヨーネン皮内反応では陽性と判定される個体が認められ

表2 IFN- 検査成績 (\*IFN- 濃度 : ng/ml)

Antigens	Animal #								
	31	32	33	34	35	E-11	E-15	E-16	
J-PPD	36.83	40.47	11.79	15.99	7.39	0.18	0.50	0.19	
B-PPD	10.50	4.5	1.52	0.84	1.15	0.15	0.32	0.08	
Con A	16.32	6.3	1.61	1.58	1.27	5.46	3.19	1.54	
Control	0.01	0.06	0.00	0.00	0.14	0.16	0.09	0.08	

Animal #31-35はヨーネ菌実験感染牛、E-11,15,16は健康牛Controls

表3 各種モノクローナル抗体のヨーネ菌及び鳥型結核菌に対する反応性

Mab Clone	<i>M. paratb</i>		<i>M. avium</i>	
	Whole cell	Whole cell	Sonicated Ag	Sonicated Ag
290			+++	+++
289-2				
142-3	+++		+	+
53-4	+		+++	+++
185-3	+		++	+++
308-3				
G27-8			+	++
118				
440-7	+	+		
118-8				
711-1	+++			
242-1			+++	+++
G28-7			+	++
53-4	+			
142-3			+++	+++
290-6			+++	+++
346				
43-2	+		+++	+++
805-8				
287-2		+	+	+
713-1				
141-8	+	+	+++	+++
305-6	+		+++	+++
346-1				
34-1				
308-3				
655-2			+++	+++
341-4				
182-1				
78-4	+	+		

加熱死菌全菌体及び超音波処理菌液を抗原として、Dot-blotting法によりMabの反応性を調べた。

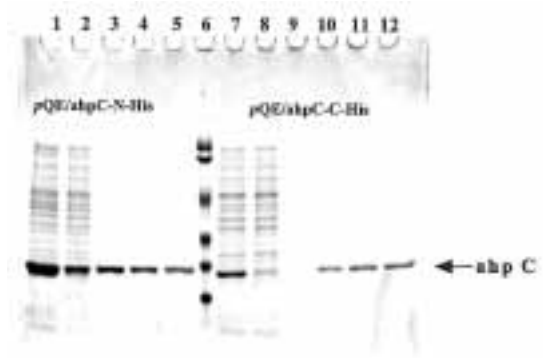


図6 遺伝子組換え型ヨーネ菌ahp C  
サンプル#1, 7: IPTG誘導大腸菌、2, 8: ニッケルカラム非吸着画分、9: 25mMイミダゾール洗浄画分、3, 10: 100mMイミダゾール溶出画分、4, 11: 250mMイミダゾール溶出画分、5, 12: 500mMイミダゾール溶出画分、6: 分子サイズマーカー

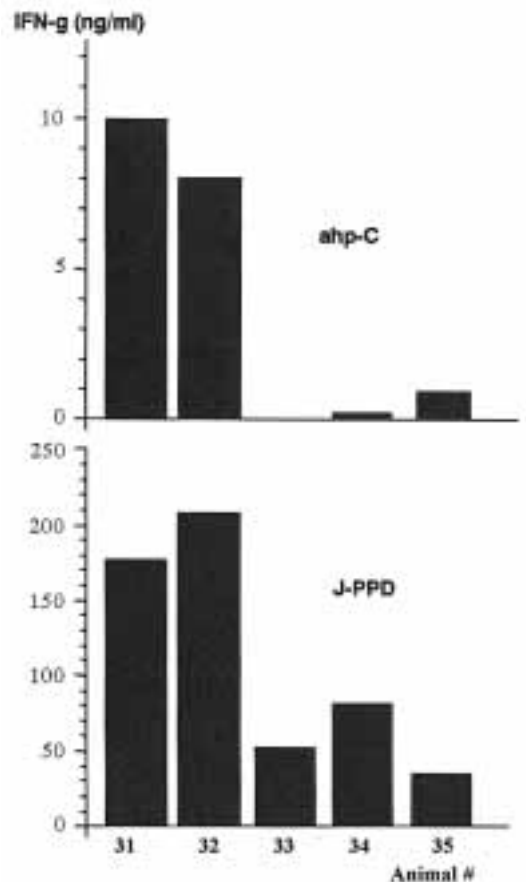


図7 遺伝子組換え型ahpCによるIFN- の誘導  
ヨーネ菌実験感染牛の血液1mlに精製ahp-C及びJ-PPDを添加し、24時間培養後の上清中IFN- 濃度

なかったのに対し、IFN- $\gamma$  検査では1歳以下の幼弱牛を中心にIFN- $\gamma$  産生を示す個体が認められた。このように、IFN- $\gamma$  検査は細胞性免疫を指標としたヨーネ病の診断法として高い感度を有することが示唆された。

### 3. ヨーネ菌特異抗原及び表面抗原の解析と診断への応用

ヨーネ菌抗原の解析と特異性の高い抗原物質の同定は、本病診断方法の精度を現在の方法よりもさらに高めるために重要である。そこで、本菌に対するモノクローナル抗体を作成し、得られたモノクローナル抗体のヨーネ菌と鳥型結核菌との交差反応を中心として解析した(表3)。その結果、鳥型結核菌とは反応せず、ヨーネ菌に対して特異性の高いモノクローナル抗体(Mab711-1)が得られた。本Mabはヨーネ菌を凝集することから、表面抗原を認識すると考えられた。さらに、モノクローナル抗体を用いたイミュノアフィニティークロマトグラフィーにより精製した抗原は、コロラド大学から分与を受けた抗酸菌LAMに対するMabと反応したことから、ヨーネ菌のLAMであることが明らかとなった。

Olsenら<sup>8)</sup>によって、IFN- $\gamma$  誘導能を有するヨーネ菌特異抗原として報告されたahp-Cについて、その遺伝子組換え体を作成し(図6)、組換え型ahp-CのIFN- $\gamma$  誘導能について検討した結果、図7に示したように、ヨーネ菌実験感染牛において今回作出された組換え型ahp-cにIFN- $\gamma$  誘導能があることが確認された。しかし、培養上清中のIFN- $\gamma$  濃度はPPD刺激のそれに対して非常に低い値であった。

### 4. ヨーネ菌感染マウスにおけるケモカイン応答の解析と牛MCP-1検出系の確立

野生型マウスの肝臓におけるMCP-1のmRNA発現は、ヨーネ菌感染後4日目に有意に上昇し7日まで上昇したが、21日目には低下した。この変化は肝臓組織内の肉芽腫病変の数の推移と良く一致していた。一方、TNFa-KoマウスではMCP-1の発現は野生型に比べ有意に低かったが、野生型マウスで発現量低下の見られた21日目にも低下が見られなかった。病理組織学的所見で、TNFa-Koマウスの肉芽腫は非常に未熟で、感染後21日目にも多数の単球マクロファージが肝臓に認められたことから、MCP-1の発現と病変中の単球マクロファージ系(MPS系)細胞の浸潤の程度は一致していた。脾臓での発現は両群とも比較的類似した推移を示した。一方、RANTESの肝臓における発現は野生型マウスもTNFa-Koマウスも感染後7日までは上昇し、21、42日まで保たれたが、TNFa-Koマウスでは一旦21日で低下後に43日

牛MCP-1、product size: 236bp  
 sense: 5'-CCTCCTGTGCTGCTACTCA-3  
 antisense: 5'-CTGGACCCATTTCTGCTTGG-3'

図8 牛MCP-1 RT-PCR用プライマー

には著しい上昇を示した。脾臓におけるRANTESの発現は野生型マウスでは肝臓とやや異なり、感染21日目以後低下したが、TNFa-Koマウスでは著しい上昇を示した<sup>7)</sup>。本実験よりヨーネ菌感染においてはMCP-1の上昇が確認できたことから、牛におけるMCP-1の検出系の検討を行った。データベース上の牛MCP-1のRNA配列より8組のRT-PCR用のプライマーを設計し、検討を行ったところ、genomic DNAの増幅もなく、非特異的バンドの形成もなく良好な結果を示すプライマーが得られた(図8)。また、RT-PCRで得られたcDNAについてシーケンスを実施したところ、牛MCP-1の特異配列と一致し検出系が確立された。

### 考察

ヨーネ菌のみが持つと考えられているIS900遺伝子をターゲットとして、糞便中に存在するヨーネ菌遺伝子をPCR等の遺伝子増幅法により検出する診断法は、迅速診断法として期待されている。糞便からDNAを抽出しPCR用のテンプレートDNAとして用いる場合、抽出液の中に含まれるPCR阻害物質の作用を抑制して偽陰性となることを防ぐことが重要である。この糞便由来物質によるPCR阻害作用を抑制する為に、今回使用した試薬Ampdirect<sup>®</sup>の反応系への添加は有効な手法であることが明らかとなった。さらに、各糞便サンプルのPCR阻害作用の強弱を検出することが可能なIC-PCR法では、本来のターゲット及びinternal control共に増幅されない糞便サンプルは、そのPCR阻害作用が強いことが疑われるため、抽出DNAを希釈する等の方法により再試験が必要となる。野外牛1,239頭にIC-PCRを実施した成績では、81頭が陽性であったのに対し、実際にヨーネ菌が分離されたのは9頭にしか過ぎなかった。この不一致は、ヨーネ菌培養に比べPCRによるヨーネ菌DNA検出の方が感度が高いことを示している。このような高感度はPCR法のメリットであると同時に、ごく少量のヨーネ菌DNAがサンプルを汚染した場合、PCR検査成績が陽性となる為、汚染防止に注意し検査を慎重に行うことが重要である。

インターフェロン・ガンマ (IFN- $\gamma$ ) は種々の機能を有するサイトカインであり, マクロファージ機能を活性化作用により, 感染症の防御に重要な役割を担うサイトカインの一つとされている。IFN- $\gamma$  は, 抗原提示細胞から抗原提示を受けた活性化T細胞から主に産生されることから, 病原体由来の抗原で末梢血単核球等を刺激し, 一定時間培養後の上清中IFN- $\gamma$  濃度を測定することにより, その抗原に対する宿主の細胞性免疫の状態を知ることが可能である。培養上清中に高濃度のIFN- $\gamma$  が検出された場合, その宿主は当該抗原を有する病原体に対する細胞性免疫が活性化していると考えられることから, IFN- $\gamma$  産生能を検査することにより, 細胞性免疫を指標とした感染症の診断が可能である。ヨーネ病についても, ヨーネ菌あるいは鳥型結核菌抗原を用いたIFN- $\gamma$  検査について既に多くの報告がある<sup>1, 4, 5, 10, 11</sup>)。報告の多くは, IFN- $\gamma$  検査法がヨーネ病診断法として有用であることを示唆しているが, 検査法の術式や判定等に関して, 未だ確立されていないのが現状である。StableとWhitlock<sup>10)</sup> は, 採血後1日経過した血液サンプルについてIFN- $\gamma$  検査を実施し, IFN- $\gamma$  産生の陽性コントロールとしてCon Aを用い, ヨーネ菌の超音波破砕抗原を添加した血液培養上清中のIFN- $\gamma$  ELISA値が, 無刺激培養上清のそれより0.1高いとき陽性とする判定方法について報告している。一方, Jungersenら<sup>4)</sup> は, 陽性コントロールとしてはCon Aよりもブドウ球菌エンテロトキシンB (SEB) が優れていること, 結果の判定方法としては, J-PPDを添加した血液培養上清中のIFN- $\gamma$  ELISA値が, 無刺激コントロールより高いことだけでなく, B-PPD添加のそれより高いことを基準にすることが望ましいとしている。また, 彼らは採血後1日経った血液サンプルでは, IFN- $\gamma$  産生能が低下しているため, 検査は採血後8時間以内に行うことを薦めている。我々の実験感染牛におけるIFN- $\gamma$  検査では, 陽性コントロールとしてCon Aを用いたが, 全ての牛においてJ-PPDを添加した血液培養上清中のIFN- $\gamma$  濃度が, Con Aのそれより高い値を示した。非感染牛ではCon A添加血液培養上清中のIFN- $\gamma$  濃度が最も高値を示すことから, IFN- $\gamma$  検査陽性の判定基準として, Jungersenらの基準に, J-PPD添加血液培養上清中のIFN- $\gamma$  濃度がCon Aのそれ以上であることを加えるのが望ましいと思われる。また, 著者らのIFN- $\gamma$  検査においても, 血液サンプルを室温あるいは4℃冷蔵庫に1日保存すると, IFN- $\gamma$  産生が低下することを確認しているため, IFN- $\gamma$  検査は採血後速やかに実施することが望ましい。

ヨーネ菌感染牛の末梢血単核球 (PBMC) のCon Aに対する反応性が低下していることは既に報告されているが<sup>9)</sup>, その低下は臨床的にヨーネ病を発症した牛において認められている。これに対し, 著者らの実験感染牛は臨床的にヨーネ病の症状が観察されない時点においても, J-PPD刺激に対するIFN- $\gamma$  産生量がCon A刺激に対するより高いことから, 発症前においても既にCon Aに対するPBMCの応答能が低下している可能性を示している。これらの成績は, ヨーネ菌感染牛では, Con Aの様な非特異的マイトージェンに対する応答能が低下している可能性を示唆しており, ヨーネ菌感染により惹起される宿主の免疫抑制現象と関連するものとして興味深い。

現在, ヨーネ菌は鳥型結核菌の亜種として, 細菌学的に分類されている。一般に菌種の型別に用いられる16S rRNA遺伝子やGyrase B subunit遺伝子における相同性を比較すると, 鳥型結核菌とヨーネ菌との相同性は, それぞれ99.7%及び99.9%と極めて類似している。さらに, 両菌の抗原性状も類似しており, 血清学的診断上重要だと考えられている分子量約32-42 kDaの菌体成分は, 両菌種とも保有しているが, それらの病原性は両者では全く異なっている。そこで, 両菌種の病原因子あるいは発病機構の解明とともに, ヨーネ菌の抗原分析を行い特異性の高い抗原を用いた診断方法の開発が, 本病診断法の精度をより高めるために重要である。今回行ったヨーネ菌に対するMabの作出とそれらを用いた抗原解析により, ヨーネ菌LAMを認識するMabは鳥型結核菌とは反応しないことから, これらのMab及びLAM抗原を応用した診断法についてさらに検討していく予定である。遺伝子組換え型ahp-CのIFN- $\gamma$  誘導能について検討した結果, 培養上清中のIFN- $\gamma$  濃度はPPD刺激のそれに対して極めて低い値であった。PPDは種々の蛋白が含まれるヨーネ菌培養上清の粗精製蛋白画分であることから, 両者のIFN- $\gamma$  誘導能を直接比較することは難しいが, ahp-cはPPD中のIFN- $\gamma$  誘導能を有する重要な抗原成分の一つである可能性もあり, 今後さらに, 抗原の投与量, 本組換え抗原に対するヨーネ菌感染牛のIFN- $\gamma$  応答について詳しく検討していくことが必要である。

マウスを用いた実験よりヨーネ菌感染においてはMCP-1 mRNA発現の上昇することが確認され, その変化は肝臓組織内の肉芽腫病変の数の推移と良く一致していた。これらの成績は, MCP-1のヨーネ病々変形成における何らかの役割を示唆している。牛におけるMCP-1の発現動態に関する報告はないが, 今回確立された牛MCP-1検出系を利用して, 本サイトカインの感染牛にお



ける動態を調べることは興味深い。さらに、MCP-1等のケモカインが本病の病変形成に特異的に関与するとすれば、ケモカイン測定による本病診断の可能性も考えられる。現在、ヨーネ病感染牛と非感染牛の末梢血単核細胞や血液を用いてヨーネ菌抗原やPPD、LPS等による刺激時のMCP-1の発現の特異性を検討中である。本研究で得られたデータや測定技術は生研機構プロジェクト「ウシヨーネ病とヒトの炎症性腸疾患における粘膜環境維持機構の解明」において継続して研究を行っている。

このように、本所内研究プロジェクトでは様々な角度からヨーネ病の診断に関する研究が進められた。糞便中のヨーネ菌遺伝子を検出する診断方法は、その迅速性から早期の実用化が期待されている。また、感染初期の罹患動物を摘発する上で、ヨーネ菌に対する細胞性免疫応答を指標とする診断方法は重要であり、ヨーネ菌細胞性免疫誘導抗原の解析、IFN- $\gamma$ に加え、他のサイトカイン産生を指標とした診断方法等の確立も期待される。今回のプロジェクトによって得られた研究成果や基礎的技術が野外においても有用な診断法として応用されるよう、今後さらに多くのデータを蓄積していかなければならない。

### 謝 辞

本研究は平成12～13年度所内プロ、診断技術向上対策事業、並びに(株)島津製作所との共同研究で得られた成果の一部である。PCR検査、IFN- $\gamma$ 検査等に御協力いただいた都道府県各位に深謝いたします。

### 引用文献

- 1) Billman-Jacobe H. et al.: A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. Aust Vet J. 69, 25-8 (1992).
- 2) Hamasur B., Kallenius G. & Svenson SB.: A new rapid and simple method for large-scale purification of mycobacterial lipoarabinomannan. FEMS Immunol Med Microbiol. 24, 11-7 (1999).
- 3) J. Haagsma.: Avian tuberculosis. In OIE Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 4th ed., 718-725, Office International des Epizooties, Paris, France (2000).
- 4) Jungersen G. et al.: Interpretation of the gamma interferon test for diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. Clin Diagn Lab Immunol. 9, 453-60 (2002).
- 5) McDonald WL. et al.: Evaluation of diagnostic tests for Johne's disease in young cattle. Aust Vet J. 77, 113-9 (1999).
- 6) 三木隆広, ほか: DNA簡易抽出法を用いたPCR法によるヨーネ菌の検出および同定. 臨床獣医. 14, 28-34(1996).
- 7) Momotani E. et al.: Adhesion molecule and chemokines in granulomas by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in TNF- $\alpha$  deficient mice. Immuno. Let. 73, 490 (2000).
- 8) Olsen I. et al.: Alkyl hydroperoxide reductases C and D are major antigens constitutively expressed by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Infect Immun. 68, 801-8 (2000).
- 9) Stabel JR.: Cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells from cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis*. Am J Vet Res. 61, 754-60 (2000).
- 10) Stabel JR. & Whitlock RH. An evaluation of a modified interferon-gamma assay for the detection of paratuberculosis in dairy herds. Vet Immunol Immunopathol. 79, 69-81 (2001).
- 11) Vizard AL, Anderson GA. & Baldock FC.: A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle. Aust Vet J. 69, 121 (1992).
- 12) 横溝祐一: 牛ヨーネ病に関する最新知見と防疫戦略. 山口獣医学雑誌. 26, 1-26 (1999).

## Summary

### Studies on diagnostic methods for bovine paratuberculosis

Yasuyuki MORI<sup>1)\*</sup>, Reiko KIKUMA<sup>1)</sup>, Yoshihiro MUNETA<sup>1)</sup>, Kazuhiro YOSHIHARA<sup>1)</sup>,  
Hirokazu HIKONO<sup>2)</sup>, Eiichi MOMOTANI<sup>2)</sup>

1) Immune System Section, Department of Immunology, National Institute of Animal Health

2) Paratuberculosis and Inflammatory Bowel Disease Research Team, Department of Planning and  
Coordination, National Institute of Animal Health

Current diagnostic tests for paratuberculosis principally rest on serological assay, bacterial culture and the johnin skin test. However, diagnostic tests that are both sensitive and specific for detecting all subclinically affected animals have not yet been found. Therefore, a number of studies have been conducted in order to find rapid and accurate diagnostic methods for paratuberculosis. As a result, the following have been found; 1) PCR test with internal control DNA is accurate, sensitive and rapid for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in faecal samples. 2) In the interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) assay using johnin purified protein derivative (J-PPD), bovine tuberculin PPD and concanavalin A (Con A), IFN- $\gamma$  responses against J-PPD were the highest in affected animals. On the contrary those of Con A were the highest in healthy animals. Interpretation of the IFN- $\gamma$  assay by the higher IFN- $\gamma$  responses against J-PPD than those of Con A is preferable as one of the diagnostic criteria. 3) Monoclonal antibody (711-1-1) which recognizes the lipoarabinomannan antigen of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* did not react with *M. avium* subsp. *avium*, and showed potential usefulness in the serological tests. 4) A recombinant alkyl hydroperoxide reductase C of *M. avium* subsp. *paratuberculosis* has been prepared and successfully applied to induce IFN- $\gamma$  from peripheral blood mononuclear cells of animals infected with *M. avium* subsp. *paratuberculosis*. 5) In the course of study on the role of cytokines, monocyte chemoattractant protein-1 seems to be involved in the pathogenesis of paratuberculosis.