

研 究

牛ヨーネ病患者におけるスコアリング法による
肉芽腫性病変の比較検討柴田 千尋¹⁾・曾地 雄一郎²⁾・矢島 りさ²⁾・西 清志²⁾

1) 宮城県東部家畜保健衛生所

2) 宮城県仙台家畜保健衛生所

I はじめに

宮城県では平成13年度から乳用牛において家畜伝染病予防法第5条に基づく牛ヨーネ病定期検査を実施している。平成18年度以降には県内黒毛和種において牛ヨーネ病患者の摘発が増加し、近県での肉用繁殖牛を対象とした定期検査の動向から、平成22年度より本県においても肉用繁殖牛の定期検査が開始された(図1)。その後は大規模肉用牛繁殖農場での発生も確認されている。

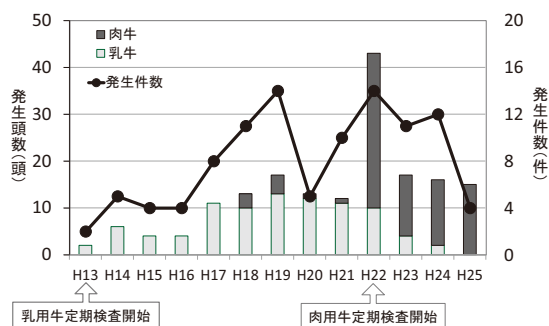


図1 宮城県内における牛ヨーネ病発生状況

患者の病理学的検査は、「ヨーネ病検査マニュアル」¹⁾(以下、検査マニュアル)を基本に行っているが、腸管の採材箇所も多く、内容也多岐に亘るため、現場において病性鑑定成績が理解しづらい問題がある。現場で病性鑑定成績書の情報を清浄化対策や農場指導等に活用しやすくするためにも、病変程度のスコアリングや病態のグレーディングなど、患者の状態を簡潔的に把握できる記述が望まれる。

ヨーネ病の病理組織学的分類についてはこれまでに牛や羊等で報告がされている^{2,3,4)}。いずれも、肉芽腫性病変や細胞浸潤の程度、抗酸菌量等の所見で分類したものではあるが、数値化したものではなく、細かな組織所見を取るにはある程度の病理学的経験の熟達が必要とされる。従って、病変程度をスコア化するなど病態を簡潔に評価する方法の策定が望まれる。そこで本調査では、ヨーネ病患者の腸管及び付属リンパ節の肉芽腫性病変と抗酸菌量をスコア化し、患者毎の病変を比較検討、さらに病態のグレーディングを試みた。

II 材料及び方法

1 材料

平成22年4月～平成25年9月までの県内牛ヨーネ病患者計91頭(黒毛和種75頭、ホルスタイン種16頭)を用いた。日齢は17日齢～13才であった。

2 検査部位

検査部位は検査マニュアルを基本とし、空腸、回腸(回盲部から上行100cm、50cm、30cm)、回盲部、結腸、直腸、腸間膜リンパ節(空腸、回腸、回盲部)の10組織とし、パラフィン切片を作成後、ヘマトキシリン-エオジン染色(以下、HE染色)及び抗酸菌染色(以下、ZN染色)下で鏡検した。

3 スコアリング方法

HE染色下では、ヨーネ病患者の特徴的病変である肉芽腫性病変(類上皮細胞及び多核巨細胞)を

「肉芽腫スコア」として評価した。1枚の切片における類上皮細胞及び多核巨細胞の出現度合いについて、0：全く観察されない、1：小型の類上皮細胞の集塊や多核巨細胞が散見、2：類上皮細胞、多核巨細胞の広がりが中程度、3：肉芽腫が大きく連続し、粘膜下組織にまで波及、4：肉芽腫がび慢性かつ正常組織構造の破壊が顕著、とし、更に各々の中間を0.5点としてスコア化し、類上皮細胞、多核巨細胞のスコアでどちらか高い方をその組織での肉芽腫スコアとした。次にZN染色下では、抗酸菌量の度合いを「ZNスコア」とし、1枚の切片において、0：抗酸菌が全く認められない、1：小型の肉芽腫内に散在、2：中程度の肉芽腫内に巣状に存在、3：連続した肉芽腫内に多発・巣状に存在、4：著しく増殖した肉芽腫内にび慢性に充満、とし、更に各々の中間を0.5点としてスコア化した。以上、各部位で肉芽腫スコアとZNスコアの合計を「病変スコア」とし、空腸～直腸まで10組織の病変スコアを合計したものを「患畜病変スコア」とした（図2 a、b）。

4 リアルタイムPCR (rPCR)

検査部位及び方法は検査マニュアルに従い、検体1gよりヨーネスピン（株）ファスマック（神奈川）を用いてDNAを抽出、rPCRを実施した。

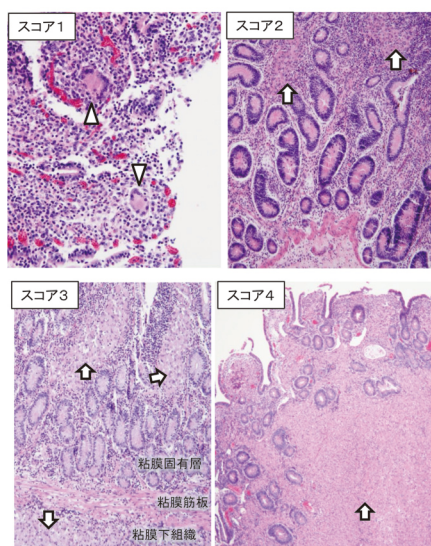


図2 a 肉芽腫スコア

矢頭：多核巨細胞、矢印：類上皮細胞。それぞれの細胞について0（全く観察されない）～4（肉芽腫がび慢性かつ正常組織構造の破壊が顕著）と評価。

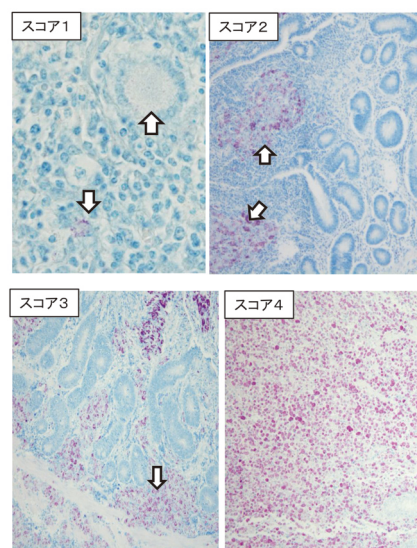


図2 b ZNスコア

矢印：抗酸菌染色（ZN染色）で染められた抗酸菌。赤く染まる抗酸菌について0（全く観察されない）～4（著しく増殖した肉芽腫内にび慢性に充満）と評価。

Ⅲ 結果

1 年齢別の病変の違い及びヨーネ菌遺伝子最大検出量と患畜病変スコアの相関

調査した患畜91頭について、2才未満と2才以上に分けて患畜病変スコアの分布を比較した（図3 a）。2才未満では軽度の病変のみであったが、2才以上では軽度から重度まで多様な病理組織像が観察され、病変スコアの分布に有意差が認められた（T検定、 $P < 0.05$ ）。

図3 bにはrPCRによるヨーネ菌遺伝子最大検出量と患畜病変スコアの相関を示した。患畜病変スコアが高くなるにつれ遺伝子最大検出量も多くなる傾向が認められた（ $r = 0.41$ ）。

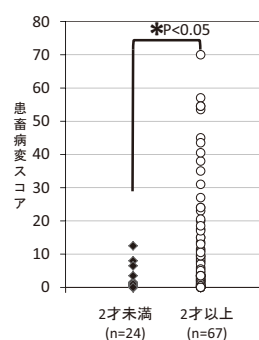


図3 a 年齢別病変スコアの違い (n=91)

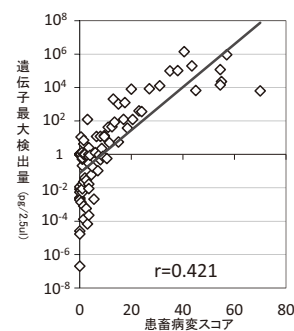


図3 b ヨーネ菌遺伝子最大検出量と患畜病変スコアの相関 (n=91)

2 腸管別の病変分布

ここでは、本調査で空腸～直腸まで全10組織の所見が認められた患畜30頭について、空腸、回腸、回盲部、大腸（結腸及び直腸）の患畜病変スコア毎の平均病変スコアを比較した（図4）。空腸～回盲部の病変は、スコアが高くなるほど病変程度も重度となったが、大腸病変はスコアが30を超える患畜でのみ認められた。

3 腸管と付属リンパ節の病変分布

図5に患畜病変スコア毎に空腸～回盲部の腸管の平均病変スコアと、その付属リンパ節の平均病変スコアに分けて病変の分布を示した。これより、患畜病変スコアが10前後で病変の分布に違いが認められた。スコアが10未満ではリンパ節の病変スコアが高く、リンパ節主体に病変の広がりが認められたが、スコアが10以上では腸管の病変スコアが高くなり、病変が腸管主体となる傾向が認められた。

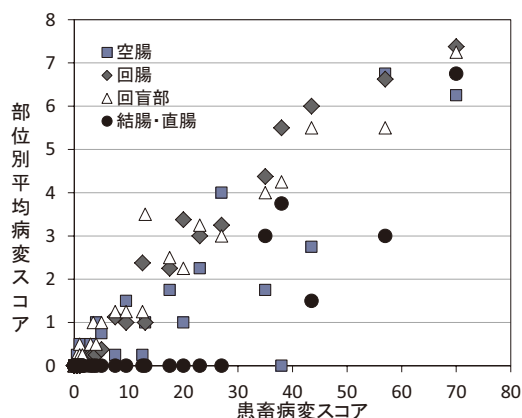


図4 腸管別の病変分布 (n=30)

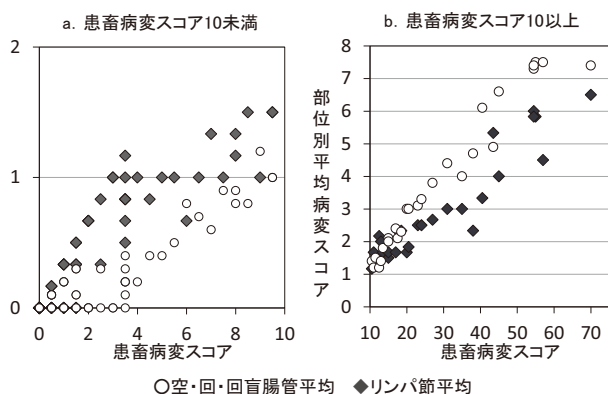


図5 腸管と付属リンパ節の病変分布 (n=91)

4 肉芽腫構成細胞の分布

類上皮細胞及び多核巨細胞について患畜病変スコア毎の肉芽腫スコアを比較した（図6）。その結果、患畜病変スコアが10前後で類上皮細胞と多核巨細胞の出現度合いに違いが認められた。患畜スコアが10未満では多核巨細胞と類上皮細胞の度合いは比較的少なく、病変も限局的であった。これらの肉芽腫病変は抗酸菌染色下では、菌塊が全く認められないか、認められても細胞内に数個観察される程度であった。さらに、患畜の中には多核巨細胞の割合が多い肉芽腫や、炎症が陳旧化している所見も認められた。

一方、患畜病変スコアが10以上になると類上皮細胞の肉芽腫スコアの方が次第に高くなり、逆に多核巨細胞は低かった。

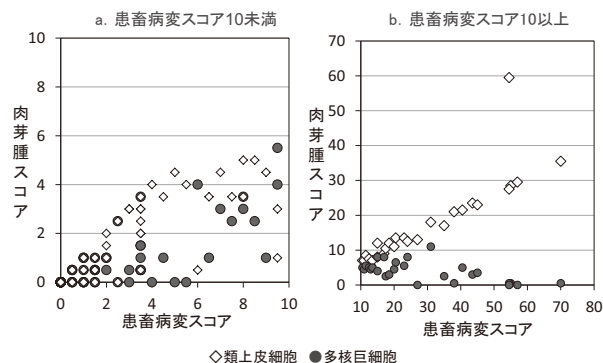


図6 肉芽腫構成細胞の分布 (n=91)

IV 考察

本調査では、ヨーネ病の特徴所見である肉芽腫性病変と抗酸菌量の度合いをスコア化し、患畜毎の病変について比較検討した。ヨーネ病は長い期間をかけて病変が形成されると言われている⁵⁾。本調査では、牛ヨーネ病の病理組織像は年齢による差が認められ、2歳未満ではほとんどが軽度、2歳以上で軽度～重度まで多様であり、重度の病変形成には長期間かかるかと推察された。ヨーネ病の細菌学的検査においてはrPCRによる遺伝子検出が行われているが、本調査から患畜病変スコアが高くなるほど、ヨーネ菌遺伝子最大検出量が多くなる傾向が認められ、病変程度と遺伝子検出量に相関が認められた。このことから、病変が重度の個体ほど大量に排菌している可能性が高いことが推察された。

肉芽腫構成細胞においては、患畜病変スコアが10前後で構成細胞の出現度合いに変化が認められた。スコア10未満では、両細胞は徐々に増えたが病変は限局的で、抗酸菌も無～数個と極めて少なかったことから、病態としては「潜伏期」の牛と推察された。また、患畜によっては西ら⁶⁾が報告しているような老熟型の巨細胞肉芽腫が主体であったり、炎症が陳旧化している像が認められる等、炎症が衰退していると推察される所見が認められ、この時期は「潜伏期」と「衰退期」が混在していると推察された。

一方、患畜病変スコアが10以上では、炎症は次第に腸管主体に類上皮細胞肉芽腫の拡大が認められたことから、この時期から炎症は「活性期」になると推察された。さらに、患畜病変スコアが30以上になると大腸病変が出現し、肉芽腫性病変の拡大も著しく、中には組織構造を破壊するほどの類上皮細胞の増殖が認められ、抗酸菌染色下では大量の抗酸菌が検出された。このことから、この時期は炎症が「最盛期」となり、rPCR遺伝子検出量の増大も併せて、環境中への大量排菌の可能性が推察された。

以上の結果から、患畜病変スコアを3つに分類した(表1)。Grade I は患畜病変スコア0から10未満のものが当てはまり、病変としては軽度、リンパ節主体に限局的な病変が認められ、病態期としては「潜伏期」または「衰退期」と推察された。Grade II は患畜病変スコア10から30未満で、病変は中等度で巣状を呈し、スコアが高くなるほど腸管に類上皮細胞主体の肉芽腫が拡大し、炎症が「活性期」に入ると推察された。Grade III はスコア30以上で、病変は重度で多発巣状、さらにはび慢性を呈すようになり、炎症が結腸や直腸まで波及した。これより患畜は「最盛期」となり、環境を高度に汚染している可能性が推察された。

本スコアリング方法は、ヨーネ病に最も特徴的な所見である類上皮細胞や多核巨細胞からなる肉芽腫性病変、及び抗酸菌染色下での抗酸菌量の度合いを指標としているため、病理経験の熟達度に関係なく比較的容易に判別できる利点があった。また、患畜病変スコアによる分類は、患畜の病態や同居牛感染の予測、畜舎汚染状況の把握等、簡潔的に農場の現状を理解するのに有効な指標であると考えられた。

今後は、これらの情報を汚染牛群の隔離や、作業動線の見直しなど生産者と一体となった農場清浄化に向けた対策へ活用していきたい。

表1 患畜病変スコアによるGrade分類

Grade	患畜病変スコア	病理所見	病態期
I	0～10	・軽度の病変。 ・病変の多くはリンパ節に認められ、限局的。 ・抗酸菌は無～少量。	潜伏期 衰退期
II	10～30	・中等度の病変。 ・病変は巣状、抗酸菌は散在～巣状。 ・腸管主体に類上皮細胞の肉芽腫性炎が拡大。	活性期
III	30～	・重度の病変。 ・病変・抗酸菌は多発巣状～び慢性に拡大。 ・炎症が結腸や直腸へ波及。	最盛期

引用文献

- 1) ヨーネ病検査マニュアル.独立行政法人動物衛生研究所.(2013)
- 2) Gonzalez J.M.V.Geijo, C.Garcia-Pariente et al.: Histopathological classification of lesions associated with natural paratuberculosis infection in cattle. J. Comp. Path. 133. 184-196 (2005).
- 3) Kurade N.P.B.N. Tripathi, K. Rajukumar et al.: Sequential development of histologic lesions and their relationship with bacterial isolation fecal shedding and immune responses during progressive stages of experimental infection of lambs with Mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis. Vet Pathol. 41. 378-387 (2004).
- 4) めん羊・ヤギの特定疾病手引き書(めん羊・山羊の特定疾病対策事業)(1997).
- 5) Momotani, E.: Epidemiological situation and control strategies for paratuberculosis in Japan. Jpn J Vet Res. 60. S19-29 (2012).
- 6) 西清志 長内利佳 真鍋智 他: 宮城県の牛ヨーネ病患畜の摘発状況と「抗体陽性および菌培養・r-PCR検査陰性牛」の病態の一考察.平成20年度宮城県家畜保健衛生業績発表会集録集. 35-38 (2009).