

原 著

本県で分離されたヨーネ菌の Variable Number of Tandem Repeats (VNTR) 法による遺伝子型別

澤田徳子¹⁾, 市村 鋭¹⁾

要 約

本県における牛のヨーネ病の発生戸数は減少傾向にあるものの、大規模農場における発生が相次ぎ、発生頭数は増加している。2011年から2020年に分離されたヨーネ菌38株(乳用牛3戸9頭由来9株, 肉用牛11戸29頭由来29株)をVNTR法で分子疫学的に解析した。乳用牛由来9株のうち1株がMap-1, 6株がMap-2, 2株がMap-3に分類され, うち8株が北海道産または育成期に北海道に預託された牛から分離されていた。これらのMap型は既報において導入元地域で検出されている型と一致し, 導入による本菌の侵入が裏付けられた。肉用牛は全29株がMap-2に分類された。うち12株(41%)が北海道, 東北, 九州等の5道県からの導入牛由来であり, Map-2が国内の肉用牛に広く浸潤する可能性が示唆された。導入牛検査の重要性を改めて示すとともに, 本県において, 更なるデータの蓄積と解析を継続する。

キーワード: ヨーネ病, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, VNTR, 分子疫学解析

ヨーネ病はヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) の経口感染により起こる反芻獣の慢性肉芽腫性腸炎であり, 長い潜伏期間の後, 持続性の下痢, 栄養状態の悪化による消瘦等を起こし, やがて死に至る [1]。本病は酪農・肉牛経営に多大な被害を与えている細菌性伝染病の一つである。[2, 3]

本病はわが国で1930年に本県種畜場が輸入した英国産ショートホーン種において初確認され [4], 以降米国及びカナダ産を中心に輸入牛で摘発されており, 輸入乳牛の偶発的疾患とみなされていた [1]。しかし, 1980年代以降に国内で集団発生事例が相次ぎ, 増加の一途を辿る [1]。1998年の家畜伝染病予防法 (法) 改正において本病は撲滅対象疾病に指定され, 法5条に基づき少なくとも5年ごとのサーベイランスの実施が定められた [5]。本県においても, 1998年から乳用牛, 2008年から肉用牛のサーベイランスを開始し, 両方で発生が確認され, 摘発淘汰による清浄化対策を進めている。発生戸数及び頭数は, 2008年をピークに,

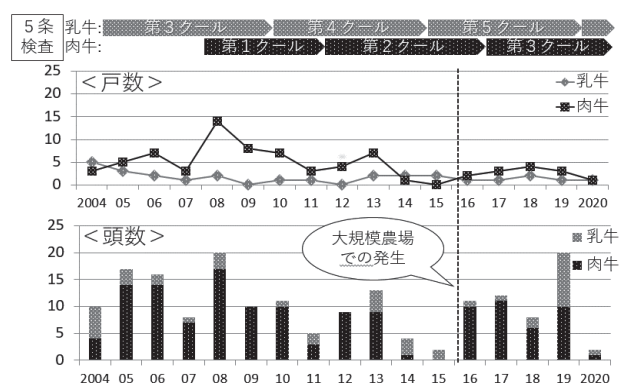


図1 近年の本県における牛のヨーネ病発生状況

2015年までに漸減したものの, 2016年以降, 大規模農場において本病が発生し, 発生頭数が再び増加傾向にある (図1)。

ヨーネ菌の分子疫学的解析手法として, これまでに IS900-restriction fragment length polymorphisms (IS900-RFLP), VNTR, Pulsed-field gel electrophoresis

1) 岩手支会 岩手県中央家畜保健衛生所 〒020-0605 滝沢市砂込 390-5
連絡担当者 (E-mail): 澤田徳子 (n-ido@pref.iwate.jp)

(PFGE), Multi-locus short sequence repeats (MLSSR) 等が報告されている [6]。中でも、縦列反復配列の反復数によって型別する VNTR 法は、識別能が高く、PCR と電気泳動装置を有する一般的な検査室で実施可能である。必要菌量が少ないため、培養に数か月を要するヨーネ菌でも速やかに実施できる。また、縦列反復配列の反復数をアリルタイプとして数値化するため、異なる検査室間でも成績の再現性が高く、遺伝子型の比較が容易である。その簡便性及び汎用性の高さから、ヨーネ菌を含む多くの抗酸菌で実施されている [7-9]。ヨーネ菌の VNTR 解析の報告は、国内では乳用牛由来株を中心に認められるが、肉用牛由来株については本県を除き見当たらない [10-16] (図 2)。

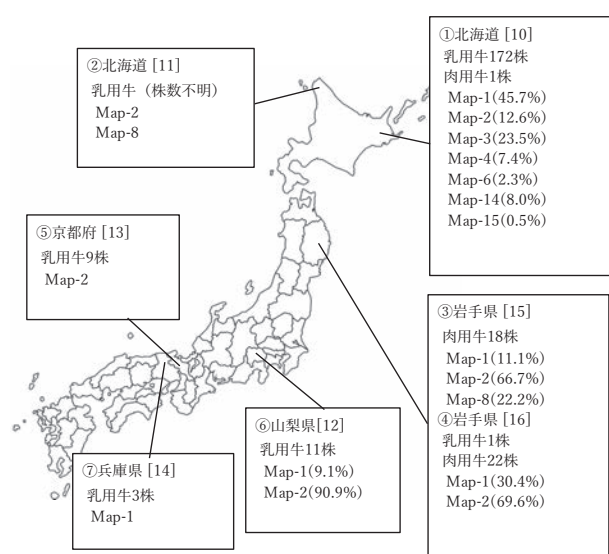


図 2 国内で報告されたヨーネ菌の Map 型

そこで、本病対策に資することを目的に、肉用牛由来株を含む近年の本県分離株を解析し、各遺伝子型の浸潤状況を確認するとともに、侵入経路を考察した。

材料と方法

供試菌株：2011 年から 2020 年に分離されたヨーネ菌 38 株（乳用牛 3 戸 9 頭由来 9 株、肉用牛 11 戸 29 頭由来 29 株）を使用した。

VNTR 用テンプレート DNA 作成：各菌株について、-80℃ 保存株からヨーネ菌用培地（共立製薬(株)）で 2 か月間培養し、GenCheck（株）ファスマック）により DNA を抽出した。上清 2 μl を TE100 μl で希釈し、テンプレート DNA とした。

VNTR (PCR)：既報 [7] に従い、17 種 (MATR-0～16) のプライマーを用いて行った。1 μL の DNA テンプレートに Hot-Start Gene RED PCR Mix 12.5 μl（株）ニッポンジーン）、プライマー（F・R）各 0.25 μl、滅菌

蒸留水 11 μl を加え、全量 25 μl になるよう調整した。94℃ 3 分間のプレヒーティング後、94℃ 20 秒、65℃ 20 秒、72℃ 10 秒の増幅サイクルを 36 回繰り返し、最後に 72℃ 7 分間の伸長反応を行った。電気泳動は、Agarose 21（株）ニッポンジーン）で作成した 2.5% アガロースゲルを用いて、0.5 × TBE バッファーにより 100V で 30～50 分泳動した。

VNTR 産物サイズの判定：得られたアリルプロファイルを基に、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門に遺伝子型（Map 型）の判定を依頼した。

成 績

検出された Map 型：乳用牛では、1 株が Map-1、6 株が Map-2、2 株が Map-3 に分類された（表 1）。9 株中 8 株が北海道産または育成期に北海道に預託されていた。a 農場では、2019 年に Map-2 による本病が発生しているが、2013 年には、北海道から導入した牛から着地時検査において同一の型が検出され、淘汰されていた。c 農場では、2 種類の型（Map-2 及び Map-3）が検出された。

肉用牛では、全株が Map-2 に分類された。このうち、12 株（41%）が北海道、東北、九州等の 5 道県からの導入牛由来であった。

f 及び j 農場では、初発時の患畜は導入牛であったが、以降の同居牛検査では多くの自家産牛が患畜として摘発された。

本県分離株の VNTR 型の推移：乳用牛では Map-2 が最多であり、2016 年まで Map-1 及び 3 型も検出されていた（表 2）。

肉用牛でも Map-2 が最多を占めたが、2004～2010 年に認められた Map-1 及び Map-8 は 2011 年以降検出されなかった。

考 察

これまで、国内では乳用牛由来株を中心に VNTR 型別が行われ、Map-1 及び 2 型が最も多数を占めている（図 2）。本州では Map-1、2 および 8 のみ検出されている [10-16]。最も解析株数の多い北海道では、Map-3、4、6、14 及び 15 と、多様な型が検出されている [10, 11]。また、輸入家畜においては、Map-1、2、8、11、13 などが検出され、国内で検出されていない型も確認されている [17, 18]。

今回の調査において、乳用牛由来株では、Map-1、Map-2 及び Map-3 が検出された。これら 9 株のうち、8 株が北海道産または育成期に北海道に預託された牛

表 1. VNTR 成績 (Map 型)

菌株 No.	分離年	農場	品種 ^{※1}	摘発根拠 ^{※2}	区分	産地及び預託歴	Map 型
1	2013	a	H	県外導入	患畜	北海道	2
2	2018			県外導入	患畜	北海道	2
3	2019			県外導入	患畜	北海道	2
4	2019			5 条	患畜	北海道	2
5	2019			5 条	患畜	北海道	2
6	2016	b	H	県外導入	患畜	自家産, 北海道預託	1
7	2014	c	H	発生農場	患畜	北海道産	3
8	2014			発生農場	患畜	北海道産	2
9	2015			発生農場	定性陽性 ^{※3}	自家産	3
10	2012	d1	B	5 条	患畜	北海道産, 九州経由	2
11	2016	d2	B	5 条	患畜	北海道産, 九州経由	2
12	2013	e 預託 1	B	発生農場	患畜	北海道産, e 農場経由	2
13	2013	e 預託 2	B	発生農場	患畜	北海道産, e 農場経由	2
14	2017	e	B	5 条	患畜	北海道産	2
15	2017			5 条	患畜	県内産	2
16	2016	f	B	5 条	患畜	北海道産	2
17	2016			5 条	患畜	北海道産	2
18	2016			5 条	患畜	北海道産	2
19	2016			5 条	患畜	東北産	2
20	2019			発生農場	患畜	北海道産	2
21	2016			発生農場	患畜	自家産	2
22	2019			発生農場	患畜	自家産	2
23	2019			発生農場	患畜	自家産	2
24	2020			発生農場	患畜	自家産	2
25	2016			発生農場	患畜	自家産	2
26	2018			発生農場	患畜	自家産	2
27	2011	g	B	5 条	患畜	自家産	2
28	2013	h	B	発生農場	患畜	自家産	2
29	2014	i	B	5 条	患畜	東北産	2
30	2017	j	B	5 条	患畜	県内産	2
31	2017			発生農場	患畜	東北産	2
32	2017			発生農場	患畜	自家産	2
33	2017			発生農場	患畜産子	自家産	2
34	2017			発生農場	患畜	自家産	2
35	2017			発生農場	患畜	自家産	2
36	2018	k	B	5 条	患畜	自家産	2
37	2018			発生農場	患畜産子	自家産	2
38	2019			発生農場	患畜	自家産	2

※ 1: H; 乳用牛 (ホルスタイン種), B; 肉用牛 (黒毛和種)

※ 2: 県外導入: 県外導入時の着地検査, 発生農場: 発生農場における同居牛検査, 5 条: 法 5 条に基づくサーベイランス

※ 3: 定性陽性: 患畜ではないが, 基準値 (1×10^{-3} pg/2.5 μ l) 未満のヨーネ菌遺伝子が検出された牛

表 2. 本県で分離されるヨーネ菌の Map 型の推移

品種 ^{※1}	Map 型	分離年 ^{※2}																		計
		2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020		
H	Map-1					1							1						2	
	Map-2										1	1				1	3		6	
	Map-3											1	1						2	
B	Map-1			2		5		1											8	
	Map-2	3	7	2		2	5	9	1	1	3	1		7	8	3	4	1	57	
	Map-8	4																	4	

※ 1: H; ホルスタイン種, B; 黒毛和種

※ 2: : 過去調査 [15, 16] : 今回調査

から分離されていた。これらの VNTR 型は、導入元の地域で浸潤する型と一致した。a 農場では 2019 年に Map-2 による本病が発生しているが、2013 年には県外導入牛から同一の型が検出されていた。また、c 農場では、2 種類 (Map-2 及び Map-3) の型が確認され、3 頭中 2 頭が北海道導入牛であった。Map-3 が分離された No.9 の自家産牛は、No.7 の導入牛が患畜と診断された頃に出生していた。このことから、No.7 の導入により持ち込まれた Map-3 型のヨーネ菌に農場内で水平感染したものと推察された。これらの成績は、導入によるヨーネ菌の侵入を裏付けるものであり、導入牛検査の重要性を示唆するものと思われた。

肉用牛由来株については、本県を除き VNTR 型別の報告が皆無である [10-16]。今回、29 株中 12 株、すなわち 41% が北海道、東北、九州等の 5 道県からの導入牛から分離されていた。また、2004~2010 年に認められた 1 及び 8 型は、2011 年以降検出されていない。このことは、現在、Map-2 が国内の肉用牛に広く浸潤する可能性を示唆するものと思われ、本県だけでなく全国的なデータの蓄積と解析が期待される。ヨーネ菌の VNTR 法は、他の遺伝子型別法と比較して、必要菌量が少なく、培養に長期間を要する本菌に応用しやすい。かつ、アリルプロファイルが数値化されることから、データベース化も容易である [7]。今後も本県分離株について解析を続け、疫学的考察の裏付けと本病対策に活用したい。

謝 辞

稿を終えるに当たり、Map 型の分類及び考察に御助言賜りました国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 動物感染症研究領域細菌グループ 川治 聡子 上級研究員に深謝いたします。

引用文献

[1] 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)

[2] 立花智，加藤一典，藤森則夫，他：黒毛和種のヨーネ病清浄化事例の経済評価，獣医疫学雑誌，2, 91-97 (2000)

[3] 榊原伸一，菅野宏，立花智：ヨーネ病が牛飼養農場に与える損失の評価：家畜衛生学雑誌，42 (4), 173-180 (2017)

[4] 田中修一：大規模黒毛和種繁殖牧場に発生した牛ヨーネ病の防疫対策，岩獣会報，32(4), 157-159 (2006)

[5] 小林創太，筒井俊之：わが国の牛ヨーネ病の発

生動向と防疫体制の現状，日獣会誌，60, 853-857 (2007)

[6] Fawzya A, Zschöckb M, Ewersc C, et al. : Genotyping methods and molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP), International Journal of Veterinary Science and Medicine, 6, 258-264 (2018)

[7] 西森敬，内田郁夫，田中聖，他：VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) 型別による結核菌群及び鳥型結核菌の分子疫学的解析マニュアル，動衛研研究報告，109, 25-32 (2003)

[8] 小川賢二：MAC の遺伝子研究，結核，86(2), 62-68 (2011)

[9] 黒河和広，打矢恵一，八木哲也，他：*Mycobacterium avium* の新規 Variable Number of Tandem Repeat 領域の有用性の検討，結核，87(7), 491-499 (2012)

[10] 齊藤真里子，山本章子，小笠原房恵：ヨーネ菌の遺伝子型別による疫学的検討，第 53 回北海道家畜保健衛生業績発表会 (2005)

[11] 前田泰治，安本守弘，山口俊昭：宗谷管内 A 町におけるヨーネ病の疫学的分析による早期清浄化へのアプローチ，宗谷管内 A 町におけるヨーネ病の疫学的分析による早期清浄化へのアプローチ，第 55 回北海道家畜保健衛生業績発表会 (2007)

[12] 牛山市忠，松下摩弥：県内で分離されたヨーネ菌の遺伝子解析及び細菌学的考察：平成 29 年度山梨県家畜保健衛生業績発表会 (2017)

[13] 寺石武史，川島康成，藤野日出海：牛ヨーネ病多発農場における遺伝子解析 (VNTR 型別) による疫学的考察のアプローチ，平成 18 年度京都府家畜保健衛生業績発表会 (2006)

[14] 寺谷知恵：管内における牛のヨーネ病発生事例，第 51 回兵庫県家畜保健衛生業績発表会 (2015)

[15] 佐々木幸治：ヨーネ病牛から分離されたヨーネ菌の VNTR 型別，平成 18 年度岩手県家畜保健衛生業績発表会 (2006)

[16] 長山玲子，井戸徳子：平成 20~23 年度に実施した肉用牛の牛ヨーネ病防疫対策の成果と課題，平成 23 年度岩手県中央家畜保健衛生所試験調査レポート (2011)

[17] 衛藤真理子：第 46 回全国家畜保健衛生業績発表会 (2005)

[18] 水森恵美：第 53 回全国家畜保健衛生業績発表会 (2012)