

## シンポジウム報告

## 第7回 International Colloquium on Paratuberculosis に参加して

尾上 貞雄

北海道立畜産試験場 畜産工学部 遺伝子工学科

## はじめに

2002年6月11日から14日に、ビルバオ市の Palacio Euskalduna Convention Hall で開催された International Colloquium on Paratuberculosis (ICP) に参加した。

このヨーネ病国際学会が行われたビルバオ市は、スペインとフランス両国の大西洋側にピレネー山脈をはさんで広がるバスク地方のスペインのバスク自治州にある中心都市であり、サッカーチーム「アスレチック・クラブ・デ・ビルバオ」や分離独立闘争で有名である。このスペインリーグ強豪ビルバオはレアル・マドリードと覇権を争う名門クラブであり、バスク出身者しか入団できないそうである。ビルバオの街は、散策路が多く、プラタナスが高くそびえているのが印象的であった。

ICP はヨーネ菌およびヨーネ病に関する国際学会で、世界から280人の研究者が集まり、病因論、免疫学、培養法、診断法、分子生物学、疫学など多分野にわたって、一般講演86、ポスター発表145が行われた。

## 基調講演

基調講演(招待講演)には、Vivek Kapur (アメリカ, ミネソタ大)の「ヨーネ菌の塩基配列解析」、Richard Whittington (オーストラリア, エリザベスマッカーサー農業試験場)の「ヨーネ病診断法の概要」、John Hermon-Taylor (イギリス, セントジョージ病院医科大学)の「ヨーネ菌とヒトのクロン病との関係」および Ramon A. Juste (スペイン, ネイカー)の「ワクチンによるヨーネ病の制圧」があった。

Vivek Kapur は、ヨーネ菌と鳥結核菌のゲノムを比較して、ヨーネ病診断のための塩基配列を明らかにし、また、ヨーネ菌の制限酵素切断片をPCR法によって選択的に増幅し、ゲノムDNAの多型を検出する方法(AFLP)の標準化を行っている。講演では、ヨーネ菌の病原性に関する遺伝学的な解明や正確で感度の高い検査方法がないことから研究を始めたヨーネ菌の全塩基配列の決定についての発表があった。その方法は、プラスミドライブラリーを構築して、全遺伝子を無作為に決定する。その後、鳥結核菌の塩基配列を足がかりに、PCR法や直接塩基配列を読む方法で空白を埋め

て、全塩基配列を決定するというものであり、ヨーネ菌の全ゲノム(4.92 M, 5178個のORF, GC含量69.3%)を解読したとのことであった。さらに、抗原をコードする遺伝子や発現の調節を同定するために、マイクロアレイの技術を用いて研究をしており、細菌の浸襲性や病原性に関する研究を促進することで、新しい抗生物質の開発だけでなく、診断薬やワクチンに使用される抗原の同定も可能になるだろうとのことであった。

John Hermon-Taylor は、マイコバクテリアに関して多くの分子生物学的研究をしており、John J. McFadden らとのヨーネ菌挿入配列 *IS900* の研究は有名である。また、Mark Tizard らとヨーネ菌とクロン病との関連を研究しており、今回は、クロン病についての発表があった。1913年にグラスゴーの外科医 Thomas Kennedy Dalziel によって、ヨーネ菌がクロン病を起こすとの発表があった後、1994年から1999年の臨床研究では、クロン病で炎症をおこしている腸にヨーネ菌は存在するのかどうかについては、相反するはっきりしない結果が出ていた。最近、幾つかの研究室で行われた有効な方法を用いたこの解答は、明解にイエスである。John Hermon-Taylor の研究では、クロン病の腸でのヨーネ菌は90%の確立で存在するとのことであり、ヨーネ菌は、ウシおよびヒツジの株があり、またヒトに馴化した株が出現していることがわかっている。しかし、ヨーネ菌は、クロン病の腸では単にわき役であり、ヒトにとっては無害であろうとのことであった。病原性を示す機構や薬剤感受性は結核と似ておらず、免疫を介してクロン病における細胞内のヨーネ菌をなくす上で、DNAワクチンは必要であり、また、種々の改善策の他に、動物やヒトのためのヨーネ菌感染予防ワクチンが必要であるとの見解であった。

スペイン、ネイカー社の Ramon A. Juste は、ヒツジにおけるヨーネ病を他の消耗性疾患と比較し、またヨーネ菌に対する抗体の研究をしている。本学会では、ヒツジとウシの血液を用いたPCRとELISAの比較をしており、ウシ、ヒツジおよびヤギにおけるワクチンについて発表した。講演では、ワクチン接種によるヨーネ病の制圧について、その歴史、ワクチン接種が普及しない理由およびワクチン使用の再評価の話が

あった。ヨーネ病のワクチン接種は、フランスの Vallee と Rinjard によって 20 世紀初頭にウシで成功して以来、フランスではウシで、アイスランドではヒツジで、ノルウェーではヤギでというように世界で古くから用いられたが、現在は行われていない。これらの実験は、臨床症状が消失し、ワクチン接種が実用的な制圧方法であることを証明している。ヨーネ病を経済的な問題として考えると、ワクチン接種は大変有利な方法である。ヒツジにおいては、少なくともヨーネ病の免疫病原性を変化させ、初期の無症状感染の進行を停止させることが明らかになっている。しかし、ワクチン接種は、獣医師が誤って自分に注射する危険があり、またワクチン接種が結核診断を妨害することから、ヨーネ病制圧のための選択として受け入れられていない。これらの問題は、改善されたワクチンで克服されるかもしれないが、ワクチン接種の主な弱点は、完全に感染を防御しないことであり、ワクチン単独でヨーネ病を根絶に導けないことである。野生動物と臨床的に健康な家畜の群にヨーネ病が伝播しているという最近の証拠は、ワクチン使用を再評価する一つの道を開くかもしれないとの話であった。

### 遺伝子診断

本学会における我々のポスター発表は、"Use of loop-mediated isothermal amplification for the rapid detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*." (LAMP 法によるヨーネ菌の迅速な検出) であったが、従来から遺伝子診断に用いられている PCR 法に関する報告は、病因学の分野で 3 題、分子生物学の分野で 11 題、公衆衛生分野で 1 題および疫学と疾病制御の分野で 2 題あった。PCR 法も従来の PCR や Nested-PCR の他に、PCR-ELISA, immunomagnetic PCR, TaqMan PCR, Alternative PCR, real-time PCR, sequence capture-PCR, optimized PCR, IMS-PCR があり、マイクロアレイなど種々の検出法開発の報告があった。なかでも、real-time PCR 法は、アイルランド大学の Jim O'Mahony と Hill C. によるサイバークリーンとライトサイクラーを使ったヨーネ菌の検出と定量に関する方法の発表があり、精度の高い方法とのことであった。この方法は、標的遺伝子に非常に特異的なプライマーとサイバークリーン色素とを用いて、ヨーネ菌を検出するものであり、サンプルの PCR サイクル毎の蛍光を測定し、記録する。その感度は、精製した鋳型 DNA で 20 コピー、単離した DNA で 50 fg、培養液中のヨーネ菌で 25 細胞であり、夾雑物があっても特異性が高く、また、培養液中のヨーネ菌数を正確に測定するとのことであった。

これに対して、我々が発表した国産技術の LAMP 法は、現在、この real-time PCR 法と同等の感度が得

られるようになっており、簡単な操作で検出できるなどコスト面での長所が多いと思われた。また、オーストラリアの CSIRO (CSIRO Livestock Industries) の Vaughan J. A. (動物におけるヨーネ病の細菌学者) らは、この LAMP 法に非常に興味があり、実用化についての質問を受けた。

### 日本からの参加者

また、本学会には、日本から農研機構動物衛生研究所免疫研究部長の横溝祐一氏、百溪英一氏、北海道支所の西森敬氏、九州支所の田中省吾氏、静岡県東部家畜保健衛生所の片山信也氏および島津製作所の児嶋浩一氏が参加した。

横溝氏は、「最近の日本における牛ヨーネ病防疫の進展」を発表した。その概要を以下に記す。

日本のコントロールプログラムは、1998 年に、5 年間隔でフレイ菌を吸収させたエライザ検査を全ての成牛で行うことになった。2 週間隔の 2 重検査で陽性を示すか、糞便培養が陽性であった牛は、補償を受けて屠畜されている。改善プログラムでは、感染牛群は、全ての牛が陰性となるまで、3 ないし 6 ヶ月間隔のエライザおよび糞便検査を受けなければならない。コントロールプログラムにより牛ヨーネ病で屠畜された頭数は、1997 年から 2001 年の期間に、3712 頭(乳牛 2272 頭、肉牛 1440 頭)に達した。また、高い感染の危険がある牛、主に患畜から生まれた子牛と同年齢の集団の牛は淘汰の対象になり、その結果、3181 頭が、この 2 年間の撲滅キャンペーンで屠畜された。1998 年から 1999 年に、日本における代表的な畜産県の北海道では、エライザ検査で 0.09% (675 頭/701692 頭)、糞便培養で 0.53% (772 頭/143250 頭) がヨーネ病と診断された。このことから、酪農の 1.6% (177 頭/10944 頭)、肉牛農家の 2.6% (76 頭/2926 頭) が、ヨーネ病に感染していることがわかった。現在、ヨーネ病の診断法が再審査されており、糞便培養の代わりに(補助的に)適切な方法として、新しくなったエライザキットに加えて糞便の PCR 検査を評価している。食肉検査では、糞便培養陽性の牛が食肉処理場に持ち込まれるのは許されておらず、検査の課程でヨーネ病感染と診断された牛は、食肉として利用されない。供給されている全ての乳製品は、完全にヨーネ菌を不活化するために加熱処理されている(チーズで 73°C/15 秒、ヨーグルトで 95°C/60 秒、生乳で 130°C/2 秒)。このことは、我国は、ヨーネ菌に対して厳密なコントロールを規定しており、その結果、ヨーネ菌の混入を制御するために酪農および食肉製品の高い清浄度を保証している。

同じく動衛研の百溪氏は、ヨーネ菌の病原性における IL-18 の役割を理解するために IL-18 ノックアウトマウスにヨーネ菌 ATCC10698 株を腹腔内に注射し、接種後、1, 2, 3, 5 週後に組織および免疫組

織病理学的変化、臨床知見、炎症性のサイトカインおよびケモカインの発現について検討して、「IL-18欠損マウスを用いたヨーネ菌の実験感染」を発表した。ここでは、組織における肝臓の類上皮細胞の肉芽腫、腸間膜リンパ節の肉芽腫性変化を調べ、炎症性のサイトカインおよびケモカインのパターンをRT-PCRで測定して、肉芽腫形成と宿主の防御におけるIL-18の役割を検討した。

動衛研北海道支所の西森氏は、「VNTR型別（縦列反復配列の反復数による型別）に基づくヨーネ菌の分子型」を発表した。ヨーネ菌遺伝子の17座位にある縦列の反復DNAの可変数に基づくフィンガープリント法は、BLASTサーチ（相同性検索）とPCRを用いて開発され、184分離株に7対立遺伝子のプロフィールが検出された。それらは、鳥結核菌の参考株と比較して、相同的なプロフィールを示した。この方法はヨーネ菌だけでなく鳥結核菌分子疫学のための計数的なデータベースを作製する迅速で簡易な方法であることが示唆されたとのことであった。

動衛研九州支所の田中氏は「ヨーネ病罹患牛の回腸の異なった肉芽腫性病変におけるサイトカイン遺伝子の発現」を発表した。

牛ヨーネ病の肉芽腫性病変はライ腫型および類結核型の2つの型に分類される。ライ腫型の病変は多数のマクロファージからなる肉芽腫と多くのヨーネ菌を有する類上皮細胞が拡散したものになる。類結核型の病変は少しのマクロファージと多数のリンパ球からなる限局的な肉芽腫として分類される。この研究では、回腸組織の2タイプの肉芽腫性病変におけるサイトカイン遺伝子発現を比較した。回腸の試料は、感染していない対照の雌牛とエライザや糞便培養検査で診断した感染雌牛から採取し、サイトカインmRNAを検出するためにRT-PCRやin situ hybridizationを行った。全ての感染雌牛は、臨床徴候のない初期にあり、類結核型の病変は4頭で観察され、ライ腫型の病変は2頭で観察された。サイトカインを調べたところ、IL-2、Th2型サイトカイン、IL-4およびIL-10は、類結核型よりもライ腫型でより多く発現した。しかし、IL-12の発現は感染と非感染の群間で異なり、しかも、IL-18は、類結核型よりもライ腫型で、また非感染群で低く発現した。さらに、IL-1 $\beta$ と腫瘍壊死因子TNF $\alpha$ は類結核型よりもライ腫型でより多く発現した。それに反して、Th-1型サイトカイン、インターフェロンIFN- $\gamma$ は、ライ腫型よりも類結核型でより多く発現した。これらの結果は、ライ腫型病変や類結核型病変の形成が、Th-1/Th-2型のサイトカイン産生に影響しており、IL-18はTh-1とTh-2のスイッチの切替に重要な役割を果たしていることを示したとのことであった。

静岡県東部家畜保健衛生所の片山氏は口頭発表で「低水分の粗試料に接種したヨーネ菌の生存に対する

アンモニア処置の効果」を、またポスターで「ヨーネ菌の生存への紫外線Bの影響」を発表した。

口頭発表では、ヨーネ病の感染があると診断された農場において自給飼料はヨーネ菌の感染の原因になるかもしれないとのことで、低水分粗試料に接種したヨーネ菌の生存に対するアンモニア処置の効果を調べている。実験は、100gのアルファルファ乾草を樹脂製のバッグに入れ、アンモニア処置として水酸化アンモニウムを加え、封をする前に菌を含む濾紙を入れて、検討している。菌数を減少させる有効性は、材料への水の添加>調製温度の上昇>アンモニア濃度の上昇>調製期間の延長であり、材料の水分や温度が高く維持されている条件では菌数が減少するが、1、2%のアンモニアを添加することで、ヨーネ菌は低温、低水分条件で生存し、3%濃度で、生存はみられなかったとのことであった。

また、太陽光に含まれる紫外線は、牧草地の病原体に対して消毒効果があると考えられているが、ヨーネ菌に対する相対的な有効性はほとんど報告されていない。ポスターでは、ヨーネ菌BBM2201株とATCC19851株を用いて、蒸留水に懸濁したり、スラリーで希釈したりして、ヨーネ菌細胞の生存性における紫外線B照射の影響を検討し、発表した。水分条件に無関係に蒸留水中の生菌数は1.5から2.0kJ/m<sup>2</sup>の照射レベルで減少し、8.5kJ/m<sup>2</sup>の照射で検出限界以下の数まで減少したが、スラリー中のヨーネ菌は1,085kJ/m<sup>2</sup>の照射で生存し、それは数ヶ月間の日射量に等しかった。この結果は、スラリー中のまた草に隠れているヨーネ菌はたとえ太陽の光に曝されたとしても長期間生存することを示しているとのことであった。

鳥津製作所の児嶋氏は、糞便試料から細菌のDNAを効率的に抽出し、抑制物質を除去することができる新しい方法を開発し、「牛糞便試料中のヨーネ菌検出のための新しいDNA抽出法と増幅法を用いたPCRの効率性」を発表した。その方法は、菌を溶解した緩衝液中で微小なビーズを使ってDNAを抽出し、有機溶剤を使って精製する方法で、ヨーネ菌のPCR検査のため、そのDNA抽出法の有用性を古典的な熱抽出法と比較した。多数のヨーネ菌を含む鳥結核菌群のある糞便試料を用いて検討したところ、IS900特異的なPCR産物は、児嶋氏らの方法で調製した糞便DNA画分から検出されたが、加熱処理によって調製された試料からは検出されなかった。さらに、PCRのために、DNAを増幅させる試料中の抑制効果を中和する反応試薬混液（アンプダイレクト試薬）を開発し、児嶋氏らのDNA抽出方法とこのアンプダイレクト試薬を使って、実験的に感染させた子牛の糞便培養でコロニーがみられないか少ししかいない糞便試料からヨーネ菌を検出したとのことであった。

### ヨーネ菌のゲノム解読

この報告にあるように、いよいよヨーネ菌の全塩基配列が、アメリカの National Animal Disease Center (NADC) とミネソタ大によって解読された。また、オーストラリアの CSIRO (CSIRO Livestock Industries) は、インターフェロン $\gamma$ テストを試みており、これらの他に DNA ワクチンでマウスに免疫した報告もあった。

このヨーネ病は、イギリス、アメリカ、オーストラリアで大きな損失となっており、会場ではこれらの国から参加している研究者の熱心さが伝わってきた。

### おわりに

世界の著名なヨーネ病研究者が参加する学会に出席でき、大変有意義な講演を聴くことができました。このような海外での発表に参加させていただきました関係者の皆様に感謝いたします。