

液体培地による牛ヨーネ病培養検査法の普及

川治聡子¹⁾, 永田礼子¹⁾

Evaluation of the manual fluorescent MGIT culture system for isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine feces

Satoko KAWAJI¹⁾ & Reiko NAGATA¹⁾

背景と目的

反芻動物の慢性消化器感染症であるヨーネ病は、家畜伝染病予防法で規定された法定伝染病であり、その検査と防疫は全国の都道府県において進められている。牛ヨーネ病の発生は全国的に報告されており、平成27年は23都道府県で326戸、691頭が摘発された¹⁾。

現在、牛ヨーネ病検査は、平成25年4月に導入されたリアルタイムPCRによる遺伝子検査を中心に確定診断が行われている。遺伝子検査は感度が高く、迅速な判定が可能であるが、生菌と死菌の判別ができないという問題があり、真の排菌牛を摘発するには培養検査による菌分離が重要である²⁾。

糞便中に排出されたヨーネ菌の分離はヨーネ病診断のgold standardとされ、国内では、ハロルド培地等の寒天培地を用いて細菌培養検査が実施されている。しかしながらヨーネ菌は世代時間が24時間以上と増殖がきわめて遅く、寒天培地上での集落形成には最短でも2か月、株によっては5か月以上かかることがある。また、寒天培地では発育が非常に悪い、あるいはまったく発育しない株の存在が報告されており、そのため海外では液体培地の利用が推奨されている³⁾。これまでに我々は、ヨーネ菌培養用に改良された市販液体培地(BACTECTM MGITTM Para TB Medium, ベクトン・ディッキンソン社)を用いて迅速・簡便にヨーネ菌を検出・同定する方法を確立し(図1)、従来の寒天培地による培養法と比較して菌分離率の有意な向上(44.3%→62.3%)と培養期間の大幅な短縮(2.5か月→平均30.5日)を可能とし

た⁴⁾。

平成27年3月に改訂された病性鑑定指針には、これまでの寒天培地に加えて、液体培地によるヨーネ菌培養法が記載されている。液体培地の利用により、感染・排菌動物の検出率向上ならびに迅速化が期待されるため、培養検査において使用される培地は寒天培地から液体培地へと速やかに転換されることが望ましい。ヨーネ菌液体培養法の普及を図るために、本研究は家畜保健衛生所の協力を得て野外材料からのヨーネ菌の分離検査成績を集積し、その有用性を実証することを目的とした。

実証試験概要

実証試験は、ヨーネ病が継続して発生し、積極的に培養検査を実施している北海道、茨城県、埼玉県の3道県で実施した。実証試験に先立って液体培地による牛ヨーネ病培養検査法について技術研修会を開催し、検査技術の標準化を図った。

各家畜保健衛生所にて、ヨーネ病患畜(乳牛・肉牛)あるいはその同居牛(肉用繁殖牛中心)から糞便を採材し、遺伝子検査(ヨーネジーン等によるリアルタイムPCR検査)および培養検査(寒天培地・液体培地)を実施した。検体の内訳は、北海道129検体(乳用牛97, 肉用牛32), 茨城県36検体(乳用牛34うち3検体は環境由来便, 肉用牛2), 埼玉県41検体(すべて肉用牛)である。さらに、動物衛生研究部門に病性鑑定等で搬入された野外の自然感染牛由来糞便22検体, 実験感染牛から定期的に採材した糞便154検体についても検査を実施した。

1) 農研機構 動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域 ヨーネ病ユニット

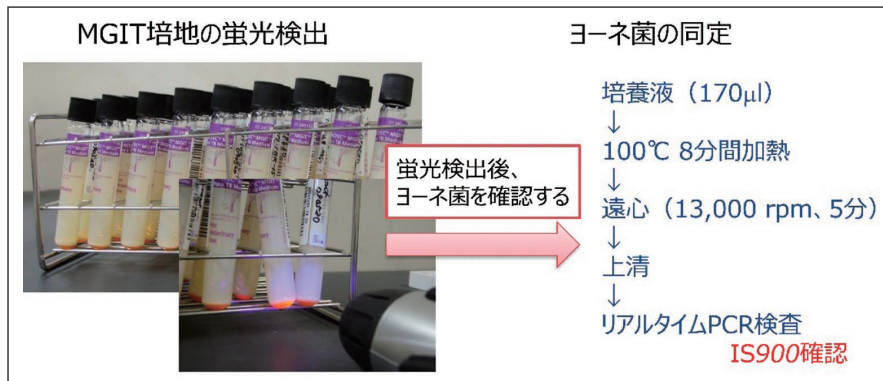


図1. 液体培地を用いたヨース菌検出・同定法

(1) 成績概要

合計 382 検体の牛糞便について、遺伝子検査および培養検査（寒天培地・液体培地）の成績を表1に示した。検査陽性率は遺伝子検査が最も高く（61.8%）、次いで液体培地（40.1%）、寒天培地（35.3%）による培養検査の順となった（表1）。リアルタイムPCRにより糞便中ヨース菌DNAを検出する現行の遺伝子検査法は、糞便培養検査よりも感度が高いと報告されており²⁾、本実証試験においても、すべての試験場所で遺伝子検査の陽性率は培養検査より高かった（表1）。

次に、液体培地と寒天培地による培養検査の成績を比

較したところ、液体培地の方が寒天培地よりも菌分離率が有意 ($p<0.05$) に高く（表2）、液体培地の利用により菌分離成績が向上するというこれまでの研究結果⁴⁾に一致した。なお、試験場所によっては寒天培地の分離率が液体培地より高かったが（表1）、有意差は認められなかった。

(2) 糞便中ヨース菌DNA量と菌分離成績

リアルタイムPCRによる遺伝子検査で定量された糞便中ヨース菌DNA量と菌分離成績を比較したところ、使用する培地にかかわらず、DNA量が多い検体ほど、

表1. 検査成績（まとめ）

試験場所	検体数	遺伝子検査 (陽性数)	培養検査 (陽性数)	
			寒天培地	液体培地
北海道	129	129	68	88
茨城	36	34	20	24
埼玉	41	7	5	4
動衛研	22 (自然感染)	21	15	17
	154 (実験感染)	45	27	20
合計	382	236	135	153
(%)		(61.8)	(35.3)	(40.1)

表2. 液体培地と寒天培地による培養検査成績

		液体培地		計
		+	-	
寒天培地	+	111	24	135 (35.3%)
	-	42	205	
計		153 (40.1%)	229	382

Kappa value=0.633, McNemar's $X^2=4.379$, $p<0.05$

菌分離率は高まることが示された（表3）。現行の遺伝子検査では、検出されたヨーネ菌 DNA を定量し、0.001 pg/well 以上をヨーネ病患者とする定量判定が導入されている。この基準は、ヨーネ菌分離成績と高い一致率を示すことを根拠に設定されたものであるが⁵⁾、今回の実証試験では、0.001 pg/well 以上の DNA が検出された糞便のうち、液体培地で 71.8%、寒天培地で 58.5% からヨーネ菌が分離された（表3, 4）。定量陽性糞便からの菌分離成績を試験場所ごとに比較すると、液体培地では 57.1%（埼玉）から 82.1%（茨城）まで、寒天培地では 53.1%（北海道）から 75.0%（動衛研・自然感染牛）まで分離率に差が認められた（表4）。遺伝子検査で定量陽性であるにもかかわらずヨーネ菌の分離率が低かった原因としては、糞便の保存状態（凍結融解等）が菌の生存性に影響した可能性や雑菌の増殖等による培地汚染のため培養成績が判定不能となった可能性等が考えられる。一方で、DNA 量が 0.001 pg/well 未満の糞便においても、約 1/3 は培養検査で陽性になった（表3）。遺伝子検査で定性陽性（定量陰性）の場合、ヨーネ病患者とは診断されないが、防疫対策上重要な情報であることを認識する必要がある。

なお、遺伝子検査陰性糞便から、液体培地で 2 検体、寒天培地で 7 検体ヨーネ菌が分離されているが（表3）、いずれも菌数が少なく、液体培地では 8 週目に蛍光が検出され、寒天培地では斜面に 1-2 個のコロニーが観察さ

れた。ヨーネ菌は細胞内で集塊状に増殖するため、検体中に均一に分散しているわけではなく、特に糞便中のヨーネ菌数が極めて少ない場合は検査結果が一致しない原因となる⁴⁾。

(3) 培養期間

寒天培地での培養期間は、最短で 7 週間、多くはコロニーが確認されるまでに 3 か月程度を要した。一方、液体培地では早いものでは 2 週目から蛍光が検出され、平均の培養期間は 6.4 週間であり、寒天培地に比べて培養期間が短縮するというこれまでの研究結果⁴⁾に一致した。ただし、液体培地の製品添付プロトコールに記載された観察期間（49 日間）を過ぎて蛍光が検出され、ヨーネ菌の発育が確認された検体が 39 検体あり、陽性検体全体の約 1/4（25.5%）を占めていた。液体培地における蛍光の検出は、専用の全自動抗酸菌培養検査装置（BACTEC™ MGIT™ 960 あるいは 320 system, ベクトン・ディッキンソン社）ではなく、UV ライト等を用いて手動で行うことも可能であるが、自動検出装置を使用する場合に比べると、検出までの日数が長くなる（＝培養期間が長くなる）傾向があると報告されている⁶⁾。全自動装置では 1 時間おきに蛍光量を測定するのに対し、手動で検出する場合は週 1 回、目視により判定していることに加えて、検査者によるばらつきもあるため、検出までの日数が長くなるのだと考えられる。これまでの成

表3. 糞便中ヨーネ菌 DNA 量と菌分離成績

	遺伝子検査 陰性	遺伝子検査陽性（DNA 量 pg/well）			
		0.001 未満	0.001-0.01	0.01-0.1	0.1 以上
検体数		48	88	38	62
液体培地 陽性	2	16 (33.3%)	48 (54.5%)	30 (78.9%)	57 (91.9%)
寒天培地 陽性	7	18 (37.5%)	36 (40.9%)	21 (55.3%)	53 (85.5%)

→ 定量陽性

表4. 定量陽性糞便からのヨーネ菌分離

	合計	北海道	茨城	埼玉	動衛研	
					自然感染	実験感染
検体数	188	128	28	7	16	9
液体培地	135 (71.8%)	88 (68.8%)	23 (82.1%)	4 (57.1%)	13 (81.3%)	7 (77.8%)
寒天培地	110 (58.5%)	68 (53.1%)	20 (71.4%)	5 (71.4%)	12 (75.0%)	5 (55.6%)

赤字：陽性率が最も高かった試験場所

青字：陽性率が最も低かった試験場所

績⁴⁾から、液体培地での蛍光の観察期間は現在12週間を設定している。

今後へ向けて

液体培地による牛ヨーネ病培養検査法は、従来の寒天培地による培養法に比べてヨーネ菌検出率が向上し、培養期間が短縮されることが確認された。試験担当者からは、今後の課題として、糞便前処理方法の簡略化を期待する意見が寄せられた。また、糞便からのヨーネ菌分離以外の活用法として、消毒効果を確認するための環境検査に用いることが提案された。遺伝子検査では死菌のDNAも検出され、生菌と死菌を判別することはできないが、液体培養法を用いることにより、消毒後の環境中に生菌が検出されるかどうかを確認することが可能である。

本実証試験で得られた成績を検証し、今後、さらにヨーネ菌液体培養法の普及を図りたい。

謝 辞

本研究は平成27年度広報・連携重点的促進費（現地実証）の研究課題として実施したものであり、多大なるご尽力を頂きました北海道宗谷家畜保健衛生所・藤吉聡氏、茨城県北家畜保健衛生所・藤井勇紀氏、埼玉県中央家畜保健衛生所・中井悠華氏、石原径佳氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) 農林水産省監視伝染病発生年報（平成27年次）：
http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html
- 2) Kawaji, S., Taylor, D. L., Mori, Y., Whittington, R. J.: Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. *Vet. Microbiol.* 125, 36-48 (2007).
- 3) Whittington, R. J.: Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *J. Clin. Microbiol.* 47, 614-622 (2009).
- 4) Kawaji, S., Nagata, R., Mori, Y.: Detection and confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in direct quantitative PCR positive fecal samples by the manual fluorescent MGIT culture system. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 65-72 (2014).
- 5) 川治聡子：ヨーネ病清浄化への新戦略. *家畜衛生学雑誌* 39, 103-106 (2013).
- 6) Gumber, S. and Whittington, R. J.: Comparison of BACTEC 460 and MGIT 960 systems for the culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* S strain and observations on the effect of inclusion of ampicillin in culture media to reduce contamination. *Vet. Microbiol.* 119, 42-52 (2007).