

Vol.3 No.3 2008

牛ヨーネ病の病態と免疫学的診断法の開発

Immunopathogenesis and diagnosis of Johne's disease

第3巻3号
2008

永田礼子

Reiko Nagata

推奨研究

牛ヨーネ病の病態と免疫学的診断法の開発

永田礼子

独立行政法人 農業・食品産業技術総合機構 動物衛生研究所 ヨーネ病研究チーム

(〒305-0856 茨城県つくば市観音台3丁目1-5)

【はじめに】

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消化器感染症であり、長い潜伏期間の後、持続性の下痢、泌乳量の低下、栄養状態悪化による消瘦等を起こし、やがて死に至る。発症までの数ヶ月から数年間は、明確な症状を示さずに持続感染する不顕性感染を特徴とする疾病である。本病は、1895年にドイツ人医師 H. A. Johne とアメリカ人病理学者 L. Frothingham により報告され、発見者 Johne の名からヨーネ病 (Johne's disease) と呼ばれている。日本では1933年に、竹原好兵によって岩手県下の輸入牛で本病発症が初めて報告された。牛のヨーネ病は1971年に家畜伝染病に指定されるまで、おそらく散発的なものにとどまっていたと考えられる。1997年に国が少なくとも5年ごとに ELISA による抗体検査の実施を義務づけたことにより、本病の年次別発生頭数は急増し、1998年以降800頭前後の牛がヨーネ病患者として摘発淘汰されている。しかし、未だ摘発頭数が減少するという状況には至っておらず、2004年には1,118頭と千頭を超え、2007年は1,048頭であった。外国の例では、米国農務省の国家家畜衛生モニターシステムによって2007年に乳用牛の農場を対象に行った調査 [10] が2008年4月に発表され、68.1%の米国の乳牛農場がヨーネ菌に汚染させていることを示した。諸外国でのヨーネ病の発生状況と比較すると、日本におけるヨーネ病摘発頭数は極めて少ない状況にあり、診断方法の改良、高度化によりさ

らに効率的に本病の防疫を進めていくことが重要である。我々はヨーネ菌抗原に対する宿主の免疫応答を解析し、本病の新たな診断法への応用を試みているので、牛ヨーネ病の病態とともに紹介する。

【ヨーネ菌の感染から発病まで】

感染経路は汚染された糞便や乳汁の経口感染が主であり、感染母牛から子牛への感染が伝播経路として重要である。同居牛への水平感染や母牛が重度のヨーネ病に罹患している場合は、胎児への胎盤感染も起こる。また、初乳中に腸管病変からリンパ行性、血行性に移行してきたヨーネ菌を含むマクロファージが含まれている [9] と、哺乳子牛にとっては感染危険要因となる。

経口感染したヨーネ菌は、パイエル板ドームのM細胞から取り込まれ [6]、組織マクロファージに貪食されるが、殺菌されることなくマクロファージ内での増殖を繰り返し、粘膜固有層に初期病巣を形成する。最近では、ヨーネ菌は腸管マクロファージによって腸間膜リンパ節に運ばれるとも言われている [15]。病巣周辺のマクロファージは、菌体からの抗原・非特異的刺激を受けて、類上皮細胞やラングハンス巨細胞へと分化して肉芽組織が形成される。感染初期には肉芽腫病巣は回腸下部の粘膜固有層と隣接リンパ節に限局するが、やがて粘膜下織へもびまん性に拡大し、末期には小腸全体に病巣は広がる。腸管粘膜組織は集塊状のヨーネ菌が認められるびまん性の類上皮細胞肉芽腫の形

成（びまん性肉芽腫性炎症）とリンパ流うっ滞により正常のそれと比較して数倍にも肥厚し、粘膜面はまるで大脳表面のような皺を形成する（わらじにも似ていることからわらじ状皺壁とも呼ばれる）。粘膜上皮細胞には異常がなく、潰瘍や出血は認められない。

感染してから潜伏期間が1年以上と長く、乳牛においては妊娠や分娩などのストレスが発病の誘因とされている。症状は慢性の頑固な間欠性の下痢、乳量の低下、消瘦等を引き起こす。回腸から腸管上部への病巣の拡大による発症は、感染した菌量や妊娠期の細胞性免疫の低下が影響すると考えられる。

【ヨーネ菌感染と宿主免疫応答】

1) 宿主の生体応答

ヨーネ菌感染における宿主の免疫反応は細胞性免疫が主体であり、Tリンパ球系細胞による細胞間相互作用が感染成立および防御の鍵となる。宿主体内に侵入したヨーネ菌は、補体受容体やマンノース受容体を介してマクロファージ内に取り込まれる。シグナル伝達に重要な分子にはToll様受容体（TLR）がある。抗酸菌のリポ蛋白はTLR2の強いリガンドであり、マクロファージのアポトーシスを誘導する。マクロファージ内には酸性環境のファゴソームがあり、また加水分解酵素が豊富であり、ファゴソームーリソソームの融合を図り、酸化窒素や活性酸素による殺菌が行われる。しかし、抗酸菌に特徴的な比較的厚い脂質に富んだ層を細胞壁に持つことで、ヨーネ菌は生存可能である。この中のリポアラビノマンナン（LAM）は種々の免疫調節作用を有し、マクロファージ由来サイトカインの産生に関わっている。IFN- γ やTNF- β のような炎症性サイトカインはマクロファージの活性化に重要である。最近では、IFN- γ 存在下で鳥型結核菌が生存するメカニズムも示されている [11]。

2) 感染初期の免疫応答

貪食されたヨーネ菌は、マクロファージのファゴソーム内に留まる間、抗原物質がマクロファージ（抗原提示細胞）表面のMHCクラスII分子を結合した形で、CD4+T細胞により認識される。一方、マクロファージ細胞質内に存在するタンパク質抗原は、MHCクラスI経路でCD8+T細胞が活性化される。また、マクロファージや樹状細胞に発現されるCD1分子は、抗酸菌リポタンパク質をT細胞に提示する。ヨーネ菌感染マクロファージはIL-1、IL-8、IFN- γ を産生し、活性化マクロファージ及び樹状細胞は、Th1系サイトカインIL-12、IL-18、IL-23を産生する。これらサイトカインはTh1細胞を刺激して、IFN- γ を産生する。しかし、感染牛において抗原刺激を受けたCD4+T細胞から大量に産生されるIFN- γ はヨーネ菌を殺菌するには不十分である [7]。細胞内寄生菌による感染防御において γ/δ T細胞の役割に関する報告は多数あり、結核菌ではNK細胞とともに結核菌の非特異的な刺激に対してIFN- γ を産生して感染の初期防御に関与する。またヒトやマウスの γ/δ T細胞は上皮細胞、M細胞から産生されるIL-15に応答して増殖するが、反芻獣の γ/δ T細胞増殖はIL-15の産生とは関係がない。反芻獣腸管での γ/δ T細胞増殖はストレスにより顕著になる [1]ことから、同時にヨーネ菌感染が起こると増殖するかもしれないが、子牛の γ/δ T細胞からのIFN- γ 産生、及びヨーネ菌感染マクロファージからのNO産生は著しくないという報告がある [7]。

3) 不顕性感染期の免疫応答

不顕性感染とは、感染していながら典型的な臨床症状がない感染時期のことである。不顕性感染時期の感染を診断することは最も困難である。この時期に細胞性免疫応答が十分であれば、宿主は回復する可能性もあるという説もある。

ここで、持続的感染マクロファージを隔離するために肉芽腫が形成される。マクロファージや CD4 + T細胞、 γ/δ T細胞から産生される TNF- α は肉芽腫形成に重要で [4]、この時期のヨーネ菌持続感染のためのキーサイトカインである。通常、Th2 サイトカインに属し、Th1 細胞に調節的に作用する IL-10 は、多くの病原菌に対する免疫応答として、過剰な炎症性サイトカインによる組織損傷を抑制する。Th2 サイトカインは CD4 + T細胞活性を抑制し、IFN- γ 産生も抑制するので、新たに動員されたマクロファージが感染しやすくなる。この時期には、抗酸菌感染でもマクロファージから IL-10 発現が誘導され、IFN- γ 産生が抑制される [2] (図 1)。不顕性感染期と比較して感染後期の IFN- γ 産生量は少ない [8]。この時期に CD4 + T細胞が抑制されるのに対して、CD8 + T細胞はまだ活性化しており、全てではないが肉芽腫形成に至る。さらに in vitro で、牛マクロファージにヨーネ菌を感染させると MHC クラス I 及び II の発現が減少すると言われている [12]。

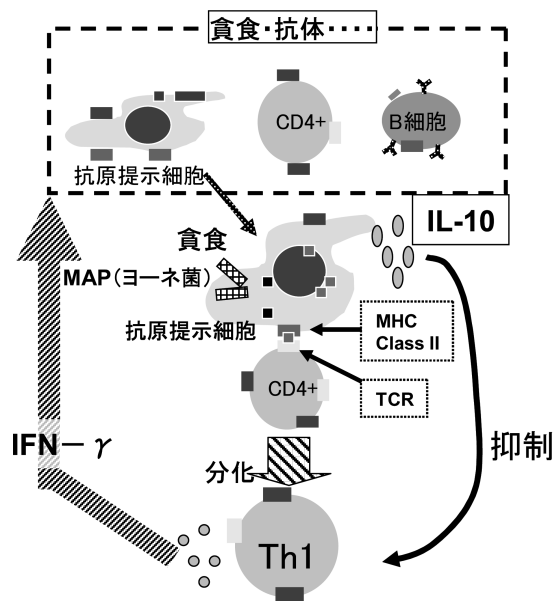


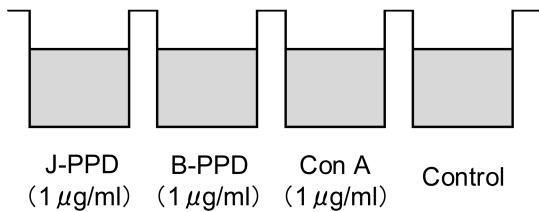
図 1. ヨーネ菌感染における IFN- γ 及び IL-10 産生

4) 感染後期の免疫応答

感染後期には多数の肉芽腫による壁の肥厚があり、排菌が認められる。また、ELISA 法により IgG 抗体応答が検出される時期である。ヨーネ菌感染牛は非感染牛と比較して、制御性 T (CD4 + CD25+) 細胞が多く [14]、IL-10 や TGF- β の抑制性サイトカインを産生し、CD4 + T細胞の活性を抑制する。感染末期の抗体価減少、CD4 + T細胞活性の極度な減退は、T細胞の活性に必要な IL-2 の減少による。

[ヨーネ病の診断法]

ヨーネ病の現行診断法は、臨床検査、細菌検査、免疫学的検査、病理学的検査である。その病原体の特性から、菌培養法でコロニーが形成されるまでに 6 週から長い場合は 5 ヶ月以上を必要とする。遺伝子検査は高感度に菌 DNA を検出することが可能であり、ヨーネ菌培養に代わる検査法として応用可能である。免疫学的検査のうち ELISA 法を用いる抗体検査、及びヨーニン検査が法で定められている。抗酸菌群は共通の菌体成分を多く保有するため、抗原的にも交差反応性が強い。細胞性免疫を指標とした検査法は、早期診断法として重要であり、現在はヨーニン皮内反応があるが、病気の進行とともに陰転するなどの問題が指摘されている。これに代わる検査法として IFN- γ 検査 (図 2) が用いられている。ヨーネ菌抗原を血液に添加し、培養後の上清中の IFN- γ を ELISA 法により測定する。現在用いられているヨーネ菌抗原は PPD と呼ばれる、ヨーネ菌培養上清から粗精製された蛋白抗原である。IFN- γ 産生の特異性を検定するために、牛型結核菌 (B-PPD) と非特異的 IFN- γ 産生物質であるマイトージェン、コンカナバリン A (Con A) を添加する。ヨーネ菌非感染牛では、Con A で刺激したときの IFN- γ 産生量が最も高いが、感染牛では J-PPD 刺激による IFN- γ 産生量が最も高くなる。



- 1) ヘパリン加血液 1 ml + 各種抗原およびマイトージェン
- 2) 混和後、37°C 5%炭酸ガス下で18~24時間培養
- 3) 血漿（培養上清）を回収し、ELISAを行うまで-20°Cに保存
- 4) ELISA法によりIFN- γ 濃度を測定

図2. ヨーネ病 IFN- γ 検査

【ヨーネ菌の抗原解析と診断法への応用の検討】

ヨーネ菌は鳥型結核菌と極めて高い相同性を有しており、抗原性状も類似しているが、病原性は両者で異なる。2005年にヨーネ菌の全ゲノム配列が公開され [5]、2006年には鳥型結核菌やその他抗酸菌との比較ゲノム解析が報告された [16]。その情報をもとにヨーネ菌特異的抗原を同定すべく、種々のヨーネ菌組換え抗原を用いた宿主免疫応答が調べられているが、診断法に有用な特異的抗原に関する報告はほとんどされていない。我々はヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーを作製し、ヨーネ菌感染早期に上昇する宿主細胞性及び液性免疫を誘導する抗原遺伝子を同定し、それらの組換え抗原を用いて宿主免疫応答を調べた。

1) IFN- γ 産生誘導抗原

IFN- γ はヨーネ菌遺伝子発現ライブラリーから IFN- γ 誘導能を有するヨーネ菌由来抗原タンパク質 MAP3184及び MAP1518を同定し、これら抗原の組換えタンパク質 Map39及び Map41（分子量39, 41kDa）を大腸菌で作出した。これらは共に結核菌で知られている PPE family protein [3] に属していた。Map39及び Map41はヨーネ菌感染牛由来末梢血単核球の IFN- γ を誘導したが、健康対照牛では有意の IFN- γ 産生は認められなかった（図3）。

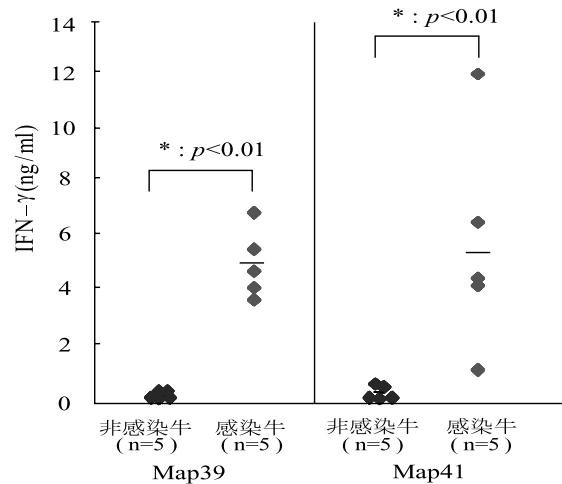


図3. 非感染牛及び実験感染牛における IFN- γ 応答

2) IL-10産生誘導抗原

組換え抗原 Map41は、ヨーネ菌感染牛末梢血細胞に対して IFN- γ だけでなく IL-10も産生誘導した。この IL-10産生は感染2-6週後から増加することから、感染2ヶ月後から陽性となる IFN- γ 検査より早期にヨーネ菌感染を検出することができた。

3) 組換え抗原の特異性

牛マクロファージにヨーネ菌と鳥型結核菌を感染させたときに IL-10の発現がヨーネ菌感染で高い [13] という特徴がある。各種抗酸菌接種モルモット脾細胞での Map41抗原刺激による各サイトカインの mRNA 発現を相対的に解析したところ、IFN- γ の mRNA 発現は、ヨーネ菌及び本菌と遺伝子レベルでの相同性が高い鳥型結核菌を接種したモルモット間に差は認められなかったが、IL-10の mRNA 発現は、ヨーネ菌接種モルモットで特異的に認められた。また各種抗酸菌接種子牛の末梢血細胞での Map41抗原刺激による IL-10産生量は、ヨーネ菌接種子牛において明らかに高かった。

4) 液性免疫誘導抗原

ヨーネ菌感染牛血清を用いて遺伝子発現ライブラリーをスクリーニングし、液性免疫を誘導する抗原遺伝子 *map* 1197を同定した。コードするタンパク質は enoyl-CoA hydratase (echA 12_2)であった。この遺伝子組換え抗原 Map-

echA に対する抗体は、他の抗酸菌を接種した子牛血清と比較してヨーネ菌接種子牛血清で高かった。Map-echA はヨーネ菌感染早期の牛血清と反応し、従来の抗原を用いた抗体検査法である ELISA 法と比較して、Map-echA 抗原を用いた ELISA 法では早期に抗体価が上昇する傾向が認められた。

【おわりに】

ヨーネ菌感染は極めて長い潜伏期間を特徴とし、感染経過によって宿主の免疫状態は変化していく。そのため、単一の検査による診断は困難であり、菌分離や遺伝子診断法の細菌検査と免疫学的診断法を組み合わせ、繰り返して実施することで、高精度かつ特異性の高い診断が可能となる。本病の特性をふまえた衛生対策と検査法でヨーネ病の防疫対策が進むことを願う。

【引用文献】

1. Burton, J. L. and Kehrl Jr., M. E. 1996. Effects of dexamethasone on bovine circulating T lymphocyte populations. *J. Leukocyte Biol.* 59 : 90-99.
2. Buza, J. J., Hikono, H., Mori, Y., Nagata, R., Hirayama, S., Aodongeril, Bari, A. M., Shu, Y., Tsuji, N. M. and Momotani, E. 2004. Neutralization of interleukin-10 significantly enhances gamma interferon expression in peripheral blood by stimulation with Johnin purified protein derivative and by infection with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in experimentally infected cattle with paratuberculosis. *Infect. Immun.* 72 : 2425-2428.
3. Cole, S. T., R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, S. V. Gordon, K. Eiglmeier, S. Gas, C. E. Barry III, F. Tekaiia, K. Badcock, D. Basham, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, T. Feltwell, S. Gentles, N. Hamlin, S. Holroyd, T. Hornsby, K. Jagels, A. Krogh, J. McLean, S. Moule, L. Murphy, K. Oliver, J. Osborne, M. A. Quail, M. A. Rajandream, J. Rogers, S. Rutter, K. Seeger, J. Skelton, R. Squares, S. Squares, J. E. Sulston, K. Taylor, S. Whitehead, and B. G. Barrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 393 : 537-544.
4. Kaneko, H., Yamada, H., Mizuno, S., Udagawa, T., Kazumi, Y., Sekikawa, K. and Sugawara, I. 1999. Role of tumor necrosis factor-alpha in Mycobacterium-induced granuloma formation in tumor necrosis factor-alpha-deficient mice. *Lab. Invest.* 79 : 379-386.
5. Li, L., Bannantine, J. P., Zhang, Q., Amonsin, A., May, B. J., Alt, D., Banerji, N., Kanjilal, S. and Kapur, V. 2005. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102 : 12344-12349.
6. Momotani, E., Whipple, D. L., Thiermann, A. B. and Cheville, N. F. 1988. Role of M cells and macrophages in the entrance of Mycobac-

- terium paratuberculosis into domes of ileal Peyer's patches in calves. *Vet. Pathol.* 25 : 131-137.
7. Simutis, F. J., Jones, D. E. and Hostetter, J. M. 2007. Failure of antigen-stimulated $\gamma\delta$ T cells and CD 4+ T cells from sensitized cattle to upregulate nitric oxide and mycobacterial activity of autologous *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-infected macrophages. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 15 : 1-12.
 8. Stabel, J. R. 2000. Transitions in immune responses to *Mycobacterium paratuberculosis*. *Vet. Microbiol.* 77 : 465-473.
 9. Streeter, R. N., Hoffsis, G. F., Bech-Nielsen, S., Shulaw, W. P. and Rings, D. M. 1995. Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrums and milk of subclinically infected cow. *Am. J. Vet. Res.* 56 : 1322-1324.
 10. USDA-APHIS (Animal and Plant Health Inspection Service). Johne's Disease on U.S. Dairies, 1991-2007.
 11. Vazquez, N., Greenwell-Wild, T., Rekka, S., Orenstein, J. M. and Wahl, S. M. 2006. *Mycobacterium avium*-induced SOCS contributes to resistance to IFN- γ -mediated mycobactericidal activity in human macrophages. *J. Leukocyte Biol.* 80 : 1136-1144.
 12. Weiss, D. J., Evanson, O. A., McClenahan, D. J., Abrahamsen, M. S. and Walcheck, B. K. 2001. Regulation of expression of major histocompatibility antigens by bovine macrophages infected with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* or *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect. Immun.* 69 : 1002-1008.
 13. Weiss, D. J., Evanson, O. A., Moritz, A., Deng M. Q. and Abrahamsen M. S. 2002. Differential Responses of Bovine Macrophages to *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium*. *Infect. Immun.* 70 : 5556-5561.
 14. Weiss, D. J., Evanson, O. A. and Souza, C. D. 2006. Mucosal immune response in cattle with subclinical Johne's disease. *Vet. Pathol.* 43 : 127-135.
 15. Wu, C. U., Livesey, M., Schmoller, S. K., Manning, E. J. B., Steinberg, H., Davis, W. C., Hamilton, M. J. and Talaat, A. M. 2007. Invasion and persistence of *Mycobacterium paratuberculosis* during early stages of Johne's disease in calves. *Infect. Immun.* 75 : 2110-2119.
 16. Wu, C., Glasner, J., Collins, M., Naser, S. and Talaat, A. M. 2006. Whole-genome plasticity among *Mycobacterium avium* Subspecies : insights from comparative genomic hybridizations. *J. Bacteriol.* 188 : 711-723.

Immunopathogenesis and diagnosis of Johne's disease

Reiko Nagata

Research Team for Paratuberculosis, National Institute of Animal Health
(3-1-5, Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0856, Japan)