

1 2 鹿のヨーネ病における病理組織学的考察

○高野 真帆 小山 朗子 林 朋弘 寺崎 敏明

要 約

令和3年6月に都内展示施設から、飼養する鹿が下痢や消瘦を呈して4頭が死亡し、展示施設で実施した死亡鹿の病理検査および死亡鹿・生存鹿の糞便細菌検査で抗酸菌を確認したとの報告があり、当所で病性鑑定を実施した。軟便を呈する鹿2頭の糞便を用いたヨーネ病リアルタイムPCRで定量陽性となり患者と決定した。病理解剖は、症状を呈していた患者2頭、子鹿2頭の計4頭(1回目)、同居畜検査で陽性となった同居畜13頭(2回目)、陰性となった1頭(3回目)の3回に分けて実施した。肉眼所見では、牛のような特徴的な腸粘膜の肥厚は見られなかった。一部個体で空回腸壁の軽度菲薄化や空腸粘膜の赤色化を認めたが、多くは外貌、腸管の著変は認められなかった。病理検査では、Ziehl-Neelsen染色(ZN染色)を全頭で実施し、更にヨーネ菌と交差性を示す抗*Mycobacterium bovis*抗体(抗M.b抗体)を用いた免疫組織化学染色を行った。重度な病変を呈した個体では、空腸から直腸の粘膜固有層と、各腸管リンパ節の皮質から髄質にかけて類上皮細胞を主体とする肉芽腫性病変が認められ、一部でラングハンス巨細胞を伴っていた。また、ZN染色により類上皮細胞や巨細胞の細胞質に多数の抗酸菌が確認された。その他、軽度の肉芽腫性病変は見られるがZN染色陰性の個体や、全く病変が認められない個体もあった。抗M.b抗体免疫染色でZN染色陰性の一部で陽性を確認でき、抗M.b抗体免疫染色はZN染色より感度が高いことが示唆された。また、病変の程度はヨーネ菌リアルタイムPCRのDNA量と相関する傾向にあった。

ヨーネ病は牛で全国的に発生が認められている家畜伝染病である。牛では、慢性の間欠性下痢や重度の消瘦を呈し、病理解剖における肉眼所見では消化管粘膜の広範囲の肥厚、横襞著明が特徴的である。病理組織検査では、粘膜固有層、粘膜下織及び腸リンパ節における類上皮細胞とラングハンス巨細胞を特徴とした肉芽腫性炎が認められ、病変部において、ZN染色により抗酸菌を認める¹⁾²⁾。今回、都内の展示施設で鹿のヨーネ病の発生があり、牛とは異なる特徴が認めら

れた。病理解剖を実施した18頭について病理学的検索を実施したので、報告する。

発生状況

当該施設は、鹿を展示用に18頭飼養しており、長期間外部からの導入はなく、自家繁殖を行っていた。2021年6月、当該施設より、飼養する鹿が水様性下痢や軟便、消瘦等により4頭死亡し、死亡鹿の病理検査及び死亡鹿・生存鹿の糞便細菌検査で抗酸菌を確認したとの報告があ

り、当所で病性鑑定を実施した。

報告時、便に異常を呈しているのは2頭のみで、他の個体に異状はないとのことだった。その2頭の糞便のヨーネ病リアルタイムPCR(qPCR)で定量陽性が確認され、ヨーネ病患者と決定した。

病理解剖は、症状を呈していた患者2頭、子鹿2頭の計4頭(1回目)、同居畜検査で陽性となった同居畜13頭(2回目)、陰性となった1頭(3回目)の3回に分け、計18頭を実施した。病理解剖を実施した18頭については表1のとおり、番号を付した。

表1 個体一覧

| 1回目(2021/6/9解剖) | | | 2回目(2021/7/14解剖) | | | | |
|------------------|------|-----------|------------------|-------------------|-----------|-----------|----|
| 雌雄 | 生年月日 | 年齢 | 雌雄 | 生年月日 | 年齢 | | |
| ① | ♀ | 2012/7/7 | 9 | ⑩ | ♀ | 2011/5/30 | 10 |
| ② | ♀ | 2010/6/19 | 11 | ⑪ | ♂ | 2015/6/4 | 6 |
| ③ | ♂ | 2021/6/4 | 0 | ⑫ | ♀ | 2016/8/7 | 5 |
| ④ | ♀ | 2021/6/5 | 0 | ⑬ | ♀ | 2017/6/2 | 4 |
| 2回目(2021/7/14解剖) | | | ⑭ | ♀ | 2019/5/29 | 2 | |
| ⑤ | ♀ | 2008以前 | >13 | ⑮ | ♂ | 2020/5/25 | 1 |
| ⑥ | ♀ | 2008/6/1 | 13 | ⑯ | ♀ | 2021/5/28 | 0 |
| ⑦ | ♀ | 2008/6/4 | 13 | ⑰ | ♂ | 2021/6/7 | 0 |
| ⑧ | ♂ | 2009/6/1 | 12 | 3回目(2021/12/20解剖) | | | |
| ⑨ | ♀ | 2010/6/30 | 11 | ⑱ | ♀ | 2011/5/28 | 10 |

材料及び方法

材料：ヨーネ病検査マニュアル³⁾を参考に、1回目は、主要臓器、腸管(回盲部より10cm、30cm、50cm、1m、空腸、盲腸、直腸、結腸)、各腸間膜リンパ節を、2、3回目は腸管(回盲部より10cm、50cm、1m、空腸)、各腸間膜リンパ節を採材した。

方法：病理解剖を実施後、以下のとおり検査を実施した。

細菌学的検査：糞便、臓器を用いて、ヨーネ菌qPCRを実施した。また、一部の検体を用いて、ヨーネ菌の分離培養を実施した。

病理学的検査：ヘマトキシリン・エオジ

ン(HE)染色での一般染色とZN染色での抗酸菌染色を常法に則って実施した。また、ヨーネ菌に交差性を示し⁴⁾、ZN染色より感度が高いと報告がある⁵⁾抗

Mycobacterium bovis (M.b)抗体を用いた免疫組織化学染色を実施した。抗M.b抗体を用いた免疫染色は、標本を脱パラフィン後、一次抗体としてウサギ抗M.bポリクローナル抗体(1:500; BioSS, USA)を使用し、0.3% H₂O₂加メタノールで前処理、0.1%アクチナーゼE、37°C10分で抗原賦活化処理、5%スキムミルクでブロッキング、免疫組織化学検査キットヒストファインシンプルステインMAX-PO(MULTI)(ニチレイバイオサイエンス、東京)とDAB基質キット(ニチレイバイオサイエンス、東京)を用いて染色を実施した。また、HE染色及びZN染色の病理所見について、ヨーネ病に特徴的な

「類上皮細胞の浸潤」、「巨細胞の出現」、「ZN染色による抗酸菌の確認」の3点について、陰性(-)から軽度(+)、中等度(++)、重度(+++)の4段階で評価した。

成績

肉眼所見：①で軽度被毛粗剛、肛門部の汚れが見られた。①、②の空回腸の一部で軽度菲薄化や空腸粘膜の赤色化が認められた。③~⑱については、外貌及び腸管の肉眼所見に顕著な病変は認められなかった。

細菌学的検査：回腸、回腸リンパ節、糞便のqPCRの各DNA量は表2のとおりであった。最も多い⑩回腸のDNA量は2.768E+04pg/wellとなり、非常に多い結

果となった。また、一部個体で菌分離が実施され、①～④、⑧、⑭、⑰の7個体でヨーネ菌が分離された。

表2 qPCR DNA量 (pg/well)

| | | | 下腿=1.0E+03 二重下腿=1.0E+03 | | |
|-------------|-----------|-----------|----------------------------|-----------|-----------|
| 回腸 | 回腸リンパ節 | 糞便 | 回腸 | 回腸リンパ節 | 糞便 |
| ① 3.511E+03 | 2.850E+03 | 1.222E+02 | ⑩ 2.089E-02 | 1.207E+00 | 1.024E-01 |
| ② 6.465E+03 | 1.139E+04 | 6.351E+02 | ⑪ 2.768E+04 | 4.673E+02 | 1.890E+02 |
| ③ 1.370E+01 | 1.439E+00 | 6.244E+00 | ⑫ 3.259E-04 | 5.237E-03 | 2.497E-02 |
| ④ 2.309E+00 | 2.080E+01 | 3.801E-01 | ⑬ 8.024E-04 | 2.203E-02 | 8.494E-02 |
| ⑤ 1.394E-03 | 1.268E-02 | 2.021E-01 | ⑭ 2.417E+02 | 5.947E+03 | 2.789E+02 |
| ⑥ 2.000E-02 | 1.248E-01 | 1.045E-01 | ⑮ 5.796E-01 | 6.356E-01 | 1.952E-01 |
| ⑦ 4.442E-01 | 6.061E+00 | 2.058E-02 | ⑯ 2.618E-04 | 2.652E-04 | 2.622E-01 |
| ⑧ 8.117E+01 | 9.107E+01 | 2.202E+01 | ⑰ 2.542E-04 | 4.857E-04 | 4.672E-01 |
| ⑨ 1.572E-03 | 3.048E-02 | 1.905E-02 | ⑱ 陰性 | 9.687E-04 | 1.190E-04 |

病理学的検査：

1 病理所見

腸管では、粘膜固有層に類上皮細胞が浸潤し、一部でラングハンス巨細胞を伴う肉芽腫性病変が形成されていた。ZN染色では、類上皮細胞の細胞質に多数の抗酸菌が認められた (図1)。

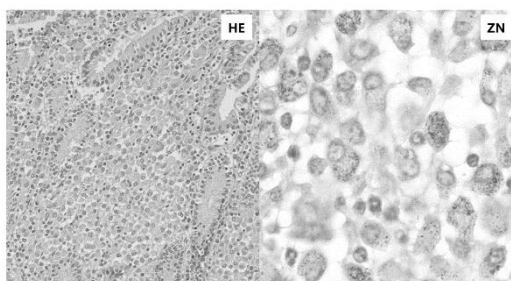


図1 ②回腸末端
類上皮細胞、ZN染色で抗酸菌確認

腸間膜リンパ節は、病変が軽度の場合、皮質側にのみ類上皮細胞の浸潤がみられ、重度の場合、類上皮細胞による肉芽腫性病変が髄質まで達しリンパ節全体が置換されていた。また、リンパ節病変内にはラングハンス巨細胞が散見された。ZN染色では、類上皮細胞及び巨細胞の細胞質に多数の抗酸菌が認められた (図2)。特に重度に病変が見られた①、②、⑩、⑭の4個体で各腸間膜リンパ節の病

変を比較したところ、同一個体でも部位による病変の差が大きく、いずれも空腸リンパ節の病変が最も顕著だった (図3)。

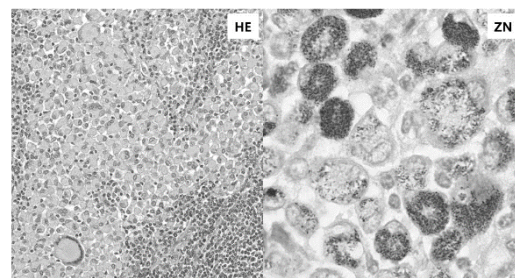


図2 ⑩空腸リンパ節
類上皮細胞、巨細胞、ZN染色で抗酸菌確認

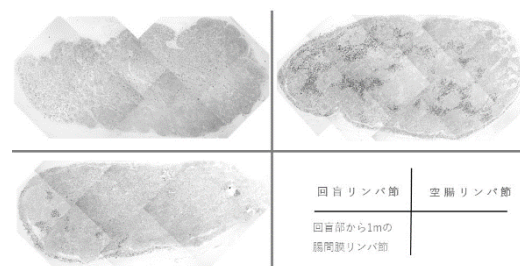


図3 ⑩回腸末端
各リンパ節 ZN染色比較

2 抗 M. b 抗体を用いた免疫染色による検索

1) 染色性の確認

ヨーネ菌 qPCR における DNA 量

4.673E+02pg/well、ZN染色陽性である⑩の空腸リンパ節を用いて抗 M. b 抗体の染色性を確認したところ、その陽性部位はZN染色陽性部位と一致した。

2) 免疫染色による感染部位の検索

第一に、腸管以外の臓器の感染状況を検索するため、①、②の肝臓及び②の心臓を材料に免疫染色を実施した。②の心臓の一部で心筋細胞の変性・壊死が認められ、この部位の変性した心筋細胞の細胞質に抗 M. b 抗体陽性反応を認めた (図4)。

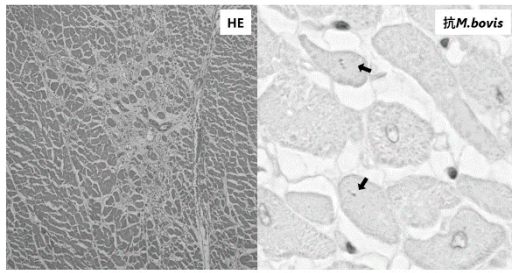


図4 ②心臓
抗*M. bovis*抗体を用いた免疫染色

①の肝臓では、肝細胞の孤在壊死が散見され、ZN染色で病変部にわずかに菌体が認められた。この部位について、変性した肝細胞の細胞質に抗*M. b*抗体陽性反応を認めた。

第二に、ZN染色陰性又はZN染色の弱陽性の腸管を検索した。腸管全体でZN染色陰性だった個体(⑤、⑫、⑬、⑯、⑰)の回腸及び回腸リンパ節、他の部位ではZN染色陽性が認められた個体(⑥、⑦、⑨、⑩、⑮)のZN染色陰性部位を材料に免疫染色を実施した。

⑫、⑬、⑯、⑦、⑨、⑩の6検体については、ヘモジデリン等の色素沈着や非特異反応が著しいため、染色の判定不可となった。

③の腸管はHE染色でコクシジウムの重度寄生が確認された。回盲部のコクシジウム寄生のない粘膜固有層の抗*M. b*抗体を用いた免疫染色を確認したところ、陽性反応を認めた(図5)。また、回盲部から50cmのコクシジウム重度寄生部位でも、コクシジウム寄生部位より深部の粘膜固有層で陽性反応を認めた(図6)。

その他、⑤の回盲リンパ節及び⑥の回盲部から50cmの腸間膜リンパ節の類上皮細胞と、⑰の回盲部の粘膜固有層で陽性反応を認めた。

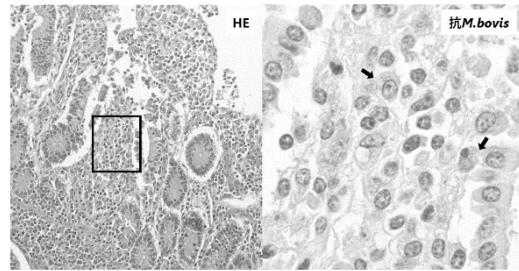


図5 ③回盲部
抗*M. bovis*抗体を用いた免疫染色

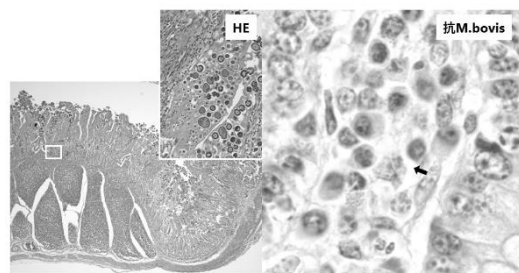


図6 ③コクシジウム寄生部位抗*M. bovis*抗体を用いた免疫染色

3 病変の程度と qPCR における DNA 量の比較

1) 病変の評価

病理解剖を実施した18頭の病理所見について評価したところ、表3のとおりであった。

表3 病理所見一覧

| 個体番号 | 回盲部 | | 回盲部から50cm | | 回盲部から50cm | | 回盲部から50cm | | 全腸 |
|------|-----|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|----|
| | ZN | 免疫染色 | ZN | 免疫染色 | ZN | 免疫染色 | ZN | 免疫染色 | |
| ① | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ② | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ③ | - | - | NI | NI | NI | NI | - | - | + |
| ④ | - | - | NI | NI | NI | NI | - | - | - |
| ⑤ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ⑥ | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ⑦ | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ⑧ | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ⑨ | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ⑩ | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ⑪ | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ⑫ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ⑬ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ⑭ | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ⑮ | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| ⑯ | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ⑰ | - | - | NI | NI | NI | NI | - | - | + |

腸間膜リンパ節と腸管を比較すると、腸間膜リンパ節の病変が重度な傾向にあった。また、個体により病変の程度に大きくばらつきがあり、感染が軽度な個体については、回盲リンパ節で病変が認めら

れる場合が多かった。病変が重度な個体については、特に空腸リンパ節での病変が顕著であった。

2) qPCR の DNA 量との比較

1) で示した各個体の病理所見全体の評価と、各個体の回腸の qPCR の DNA 量を比較した。今回、③はコクシジウムの寄生が重度で、ヨーネ病の病変がマスクされていた可能性があり、④は、死後1週間以上経過していたため死後変化が顕著で、病理検査に適さなかったことから、この2個体については、除いて考える。DNA 量の多い順に並び替えると表4のとおりであり、病理検査における病変の程度と DNA 量は相関する傾向にあった。

表4 病変の程度とDNA量の比較

| 個体 | 病変全体 | DNA量 (回腸) | 個体 | 病変全体 | DNA量 (回腸) |
|----|------|-----------|----|------|-----------|
| ① | +++ | 2.768E+04 | ⑩ | + | 2.089E-02 |
| ② | +++ | 6.465E+03 | ⑨ | + | 2.000E-02 |
| ③ | +++ | 3.511E+03 | ⑧ | + | 1.572E-03 |
| ④ | +++ | 2.417E+02 | ⑦ | ± | 1.394E-03 |
| ⑤ | ++ | 8.117E+01 | ⑥ | ± | 8.024E-04 |
| ⑥ | - | 1.370E+01 | ⑤ | - | 3.239E-04 |
| ⑦ | - | 2.309E+00 | ④ | - | 2.618E-04 |
| ⑧ | ++ | 5.796E-01 | ③ | - | 2.542E-04 |
| ⑨ | + | 4.442E-01 | ② | ± | 少 |
| | | | ① | ± | 陰性 |

考 察

本症例は、腸間膜リンパ節における類上皮細胞の浸潤による肉芽腫性病変が特徴的であった。ヨーネ病は、動物種によって病態が異なる(表5)⁶⁾ことが知られているが、腸粘膜のわらじ状肥厚が特徴的な牛とは異なり、鹿では腸間膜リンパ節が病変好発部位である。その点で、本症例は鹿のヨーネ病の典型例であると考えられる。また、腸管の肉眼所見は軽度であったが、病理検査において腸管の粘膜固有層で類上皮細胞の浸潤や多数の抗酸菌が認められた。腸間膜リンパ節及

び腸管で認められた多量の菌から、一部の個体では非常に重度に感染していたことが分かった。そのため qPCR 結果からもわかる通り、排菌量も非常に多く、群全体に比較的速い速度で伝播したものと考えられる。病性鑑定実施時期が、群全体に感染拡大した後であったため、侵入経路や初発個体等は明らかにできなかった。

表5 動物種による病変の違い

| | 鹿 | 牛 | 羊 | 山羊 |
|------|----------------------------------|-----------------------|--|----------------------------------|
| 発症年齢 | 1歳以下 ¹⁾ | 2~5歳以降 | 成獣 | 成獣 |
| 症状 | 下痢はまれ 慢性的な劇症 | 腸欠性の新しい下痢 劇症 | 下痢はまれ 慢性的な劇症 | 下痢はまれ 慢性的な劇症 |
| 肉眼病変 | 腸管病変は軽度 リンパ節の腫大 | 腸粘膜のわらじ状肥厚 リンパ節の腫大 | 腸管病変は軽度 リンパ節の腫大 | 腸管病変は軽度 リンパ節の腫大 |
| 好発部位 | 腸間膜リンパ節 | 回腸下部、大腸上部、 盲腸リンパ節 | 腸間膜リンパ節 | 腸間膜リンパ節 |
| 組織病変 | 類上皮細胞の浸潤 (らい腫瘍) 抗酸菌塊(稀は稀型) | 類上皮細胞の浸潤 (らい腫瘍) | 類上皮細胞の浸潤 (らい腫瘍) 少数で、肥胞様塊 (稀は稀型) | 類上皮細胞の浸潤 (らい腫瘍) 肥胞様塊(稀は稀型) |

参考: Pathology of Domestic Animals vol.2

抗 M. b 抗体を用いた免疫染色では、ZN 染色陰性部位や ZN 染色で陽性が少ない部位において、陽性反応が確認された。①の肝臓及び②の心臓で菌が認められたことから、腸管に重度の病変が見られた個体では、全身性に菌が感染していたことが示唆される。また、肝臓は①、②に共通して病変が認められたため、鹿における腸管以外の病変形成部位と考えられる。また、③のコクシジウム寄生部位での所見から、他の要因による病変形成により、ヨーネ病病変がマスクされている場合の、ヨーネ菌の存在証明に抗 M. b 抗体による免疫染色は有用であると考えられた。抗 M. b 抗体は他の抗酸菌にも交差性を示すため、qPCR や培養検査により免疫染色での陽性反応がヨーネ菌であることの証明が必要であるが、鹿等の症例が少ない畜種において、感染細胞やその分

布を確認する上で有用な方法である。一方、今回の鹿は色素沈着が多く認められたこと、検体のホルマリン振盪時間や死後変化、壊死等により非特異反応が高度な部位があったことから、判定不可と判断した検体が多くあった。解剖時や病理標本作成時の検体の取り扱いに注意が必要であるとともに、免疫染色の賦活化反応条件等の染色条件を検討する余地があると考えられる。

各個体の病理所見を評価した結果（表3）から、感染が軽度な個体は回盲リンパ節で病変が認められる場合が多く、回盲リンパ節は、牛と同様、鹿でも診断に重要な採材部位であると考えられる。一方、病変が重度な個体は、特に空腸リンパ節での病変が顕著であった。個体や病態により、病変の程度や病変がみられるリンパ節が異なり、肉眼所見に乏しいことから、複数の部位を採材する必要があると考える。今回は、病変の程度の異なる18頭それぞれについて複数箇所を採材し評価することで、軽度から重度まで様々な病態を確認できた症例となった。

また、病理検査における病変とqPCRのDNA量との比較を実施した結果、病理検査における病変の程度とDNA量は相関する傾向にあることが分かった。ヨーネ病の診断においては、病理検査よりqPCRの結果が先に出ることが多いため、qPCRにおけるDNA量が少ない個体については特に、病理検査における切り出し・薄切箇所を増やし、複数部位を慎重に確認することが、菌体の証明に必要と考える。

国内の鹿ヨーネ病発生の報告は少なく、1990年沖縄県で初発例が認められ

7)、その後、平成10年以降は報告がない
8)。本症例は、飼養される鹿におけるヨーネ病の集団発生という国内では珍しい事例であった。

引用文献

- 1) 日本獣医病理学会 編：動物病理学各論，第2版，185，文永堂出版，東京（1998）
- 2) 病性鑑定マニュアル，第4版，44-45，全国家畜衛生職員会，東京（2016）
- 3) ヨーネ病検査マニュアル．2018年21日版
- 4) Gutierrez Cancela MM, Garcia Marin JF : Comparison of Ziehl-Neelsen staining and immunohistochemistry for the detection of *Mycobacterium bovis* in bovine and caprine tuberculous lesions, *J Comp Pathol*, 109, 361-370 (1993)
- 5) 谷口有紀子, 田子 穰, 山本 彩乃 : 牛のヨーネ病検査における抗 *Mycobacterium bovis* 抗体を用いた免疫組織化学染色の有用性について, *北獣会誌* 64, 175~179 (2020)
- 6) Jubb, Kennedy & Palmer's : *Pathology of Domestic Animals* vol.2
- 7) 慶留間智厚 他 : 県外導入鹿に発生したヨーネ病の病理学的所見, *沖家衛試年報*第27号, 57~67 (1991)
- 8) 監視伝染病発生年報, 平成10年~令和2年

