

増感 *in situ* hybridization 法による ヨーネ菌特異的遺伝子 IS900 検出法

ヨーネ病研究チーム

田中 省吾

TANAKA, Shogo

ヨーネ病は、鳥型結核菌に近縁なヨーネ菌 *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* を病原体とし、主に牛などの反芻獣の消化管に感染して下痢や削瘦などを臨床症状とする慢性疾病である。本病は、1971年に法定伝染病（家畜伝染病予防法）に指定され、1980年以降、発生数は増加の一途をたどり、一昨年は千頭を超えたことから我が国の畜産業における最重要損耗疾病として現在認識されている。近年、本邦でヨーネ病罹患畜として摘発・淘汰される牛は、ELISA法による抗体検査のみが陽性で臨床症状を伴わず糞便からの菌分離も陰性の無症状無排菌牛が大部分を占めている。これらの牛の空回腸や腸間膜リンパ節にみられる病理組織学的変化は、発症排菌牛でみられる多数の菌増殖を伴った類上皮細胞肉芽腫形成を特徴とする感受性型病変とは対照的な抵抗性型病変である。腸間膜リンパ節における抵抗性型病変の特徴は、リンパ濾胞周囲あるいは辺縁洞近辺における小型の肉芽腫結節形成である。また、感受性型病変とは異なり、従来の抗酸菌染色（チールネルゼン法やローダミン法）や抗体を用いた免疫組織化学的染色では肉芽腫結節内に菌体を検出できない症例が多い。そのため、抵抗性型病変形成とヨーネ菌感染との関連を病理組織学的に直接証明することができなかった。また、ヨーネ病罹患牛でなくても腸間膜リンパ節における小型の肉芽腫結節形成がみられることもあるため、病変から診断を裏付けすることは困難であった。さらに近年、細胞壁欠損型（スフェロプラスト）の

ヨーネ菌の存在が報告されているが、従来法ではスフェロプラストを組織内で検出することは不可能である。そこでこれらの問題を解決するため、ヨーネ菌特異的な遺伝子である IS900 を指標とする *in situ* hybridization (ISH) 法により、腸間膜リンパ節に形成された病変内に IS900 遺伝子を証明し、ヨーネ菌感染を立証するための新たな手法の確立を試みた。

材料としては、ELISA法及び糞便培養法により野外でヨーネ病と診断された牛の腸間膜リンパ節を用いた。10%リン酸緩衝ホルマリンにて24時間以上室温で固定後、定法に従いパラフィン包埋して連続あるいはミラー切片を作製し、HE染色及び抗酸菌染色（チールネルゼン法）を行うとともに ISH法を実施した。また一部のパラフィン包埋切片からは DNA を抽出し、nested PCR法により IS900 遺伝子の検出を試み、組織切片内に IS900 が存在することを確認した。nested PCR法の陽性対照としては、ヨーネ菌 ATCC19698 株抽出 DNA を用いた。陽性対照による 2nd PCR 実施の際、増幅産物に FITC を取り込ませて ISH法で使用する FITC 標識二重鎖 PCR プローブ (294bp) を、また ISH法の陰性対照及びプローブの特異性を検討するために非標識二重鎖 PCR プローブを作製した。標識プローブの特異性の確認は、一定濃度の標識プローブとともに非標識プローブを添加し、ハイブリッド形成を競合させることで生じるシグナル強度の減少によって行った。

ISH法の手順は、まず脱パラしたパラフィン包



埋切片をプロテアーゼ K (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 37°C、15 分間処理後、4% パラフォルムアルデヒドで 10 分間再固定した。切片を 0.5M トリス緩衝液 (pH7.6) で洗浄後、10 分間 100°C で熱変性をかけた標識あるいは非標識プローブ (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) をハイブリダイゼーション液 (1ml 中組成：50% フォルムアミド、600mM NaCl、10mM Tris-HCl pH7.6、1mM EDTA、1x デンハルト液、10% 硫酸デキストラン、200 μg tRNA、1.38%SDS) に添加して 5 分間 85°C で処理した後、切片に載せて専用シールで密封し 50°C にて 16 時間反応させた。反応後、5xSSC (クエン酸緩衝液 pH7.0) で 5 分、50% フォルムアミド /2xSSC で 30 分、2xSSC/0.1%SDS で 40 分、0.2%SSC/0.1%SDS で 40 分間、いずれも 50°C で洗浄した。組織中の IS900 遺伝子とハイブリッドを形成した標識プローブの検出には、市販の増感・発色キット “GenPoint™ Fluorescein” (DaKoCytomation 社) を用いた。同キットでは、反応後に蛍光顕微鏡下でシグナルを観察することもできるが、永久標本とするため、キット付属の DAB 発色後にヘマトキシリンで染色し、光学顕微鏡下で観察した。

その結果、nested PCR 法では今回検査したすべての切片において IS900 遺伝子が検出された。また、増感 ISH 法により検出された IS900 遺伝子は、感受性型病変の肉芽腫病巣を構成する類上皮細胞や浸潤マクロファージ、多核巨細胞内に茶褐色微細顆粒状のシグナルとして多数認められた。これらのシグ

ナルは、抗酸菌染色 (チールネルゼン法) で検出される菌に比べて発現量はやや少なく、局在部位にも多少の違いがみられた。非標識プローブのみを用いた陰性対照ではこれらのシグナルは観察されず、競合 ISH 法で同シグナルの段階的な強度の減少からプローブの特異性が確認された。一方、抵抗性型病変においては抗酸菌染色で菌が検出された小型の肉芽腫結節 (図 A1 及び 2) と菌が検出されない肉芽腫結節 (図 B1 及び 2) のいずれにおいても IS900 遺伝子シグナルを検出することができた。

以上の結果から、確立された増感 ISH 法によるヨーネ菌特異的 IS900 遺伝子検出法は、通常ホルマリン固定材料で検出できるため、過去に蓄積された症例をさかのぼっての検索が可能となった。また、用いた二重鎖 PCR プローブは、RNA プローブやオリゴプローブより簡便に作製でき、冷暗所での長期保存にも耐える利点があるため、新たな診断法としての普及が期待できる。さらに本法により検出される IS900 遺伝子シグナルは、細胞壁欠損型ヨーネ菌あるいはマクロファージ系細胞内で消化処理過程にあるヨーネ菌の遺伝子断片のいずれも検出できるため、今後、不顕性感染から発症に至る病理発生機序や細胞壁欠損型ヨーネ菌の病原性を解明する上で有用な手法であると考えられる。

(次ページへ続く)

(前ページよりの続き)

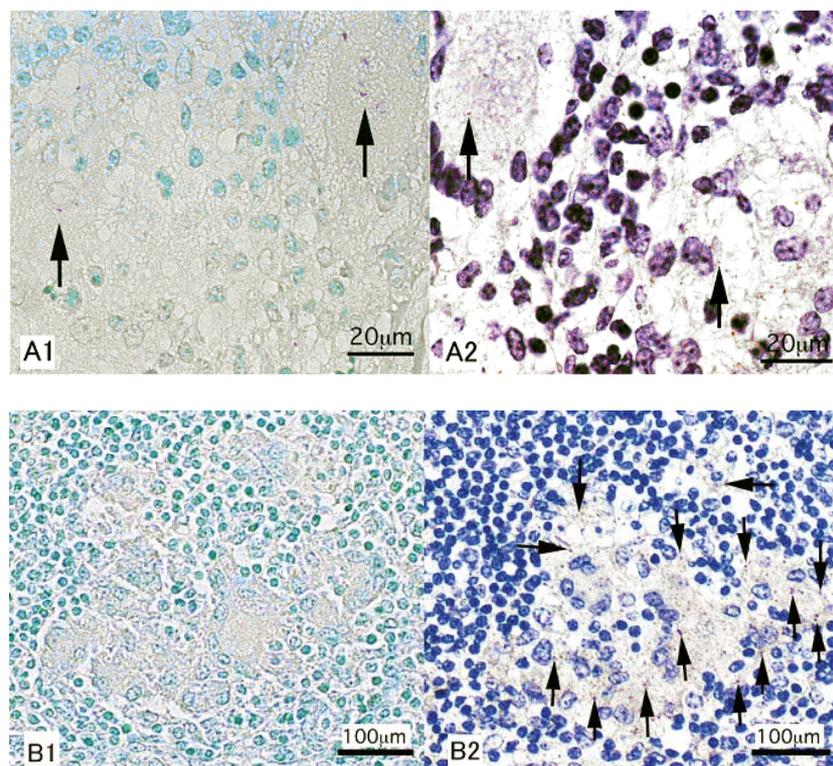


図 腸間膜リンパ節にみられた抗酸菌染色陽性の肉芽腫結節 (A) と陰性の肉芽腫結節 (B)
 A1: 肉芽腫結節内に検出される抗酸菌 (矢印) 抗酸菌染色 (チールネルゼン法)
 A2: ミラー切片上の同一細胞内に茶褐色微細顆粒状に検出される IS900 遺伝子のシグナル (矢印) ISH 法
 B1: 抗酸菌が検出されない肉芽腫結節 抗酸菌染色 (チールネルゼン法)
 B2: 連続切片上の同一細胞内に茶褐色微細顆粒状に検出される IS900 遺伝子のシグナル (矢印) ISH 法