

ヨーネ病牛における血清アポリポタンパク質 A-I 濃度の減少

及川 伸¹⁾・加藤 憲 夫²⁾・渡部 淳²⁾
西 英 機³⁾・黒沢 隆¹⁾・佐藤 博¹⁾

Serum Apolipoprotein A-I Evaluated as a Possible Marker in Cows with Johne's Disease

Shin OIKAWA¹⁾, Norio KATO²⁾, Atsushi WATANABE²⁾,
Hideki NISHI³⁾, Takashi KUROSAWA¹⁾ and Hiroshi SATOH¹⁾
(June 2000)

緒 言

ウシのヨーネ病は、わが国の家畜の法定伝染病に指定されており、乳肉の生産を著しく阻害する細菌疾病である。本症の主要な症状は、難治性の慢性下痢症であり、その病変は慢性肉芽腫性腸炎である^{6,9,15)}。原因菌である *Mycobacterium paratuberculosis* (ヨーネ菌)は糞便に排泄され、乾燥下で数年以上生存するため重要な感染源となる^{6,15)}。

わが国における本病発生の特徴として、そのほとんどが北海道に集中していることがあげられる。過去30年間の北海道における本病の年次別の発生状況を図1に示した²⁾。初めてヨーネ病の発生が北海道で確認されたのは1978年であり、たった5頭の発生であった。しかし、それから10年後には104頭に

増加し、1998年には731頭を記録した。このような数値の伸びは、診断技術の向上によるところが大であることは言うまでもないが、本病が一度発生すると、懸命な蔓延防止対策にもかかわらず、その浸潤をくい止めることが容易でないことを物語っている^{3,5,17)}。一方、他の代表的な法定伝染病である結核病は着実に減少し、平成8年からは発生を見ていない。また、気腫疽もワクチンの接種の励行や衛生管理の進歩に伴って減少してきている。しかし、ヨーネ病は、このような伝染病と比べて伝搬経路の遮断が難しく、しかも現在ワクチンも存在しないという防圧に苦慮する条件を備えていると言える¹⁴⁾。

本病の蔓延防止および発生予防の対策として、発症牛(臨床症状を示し、原因菌を排泄しているウシ)と抗体陽性牛(臨床症状は示さないが、原因菌に感染していて菌を排泄する可能性があるウシ)の早期摘発と淘汰が実践されている^{3,5,14,16,17)}。現在、ヨーネ病の診断は、細菌学および免疫学的方法により実施されている。すなわち、前者として糞便からの本菌の分離があげられるが、培養に1~3カ月と長期間を要する^{15,16)}。また後者としてELISA法による抗体検査が実施されているが^{14,16,18)}、感染ステージによって陽性と陰性の境界を示す個体が散見され、その判別は必ずしも容易とは言えない¹⁰⁾。したがって、本症の対策を円滑に推進するため、新たな診断法の開発が求められている。

われわれは、ウシの腸疾患における血清生化学的診断法の開発を推進してきた。まず、腸で合成され、生体における脂質成分の運搬や代謝に重要な役割を演じているアポリポタンパク質 A-I (高密度リポタ

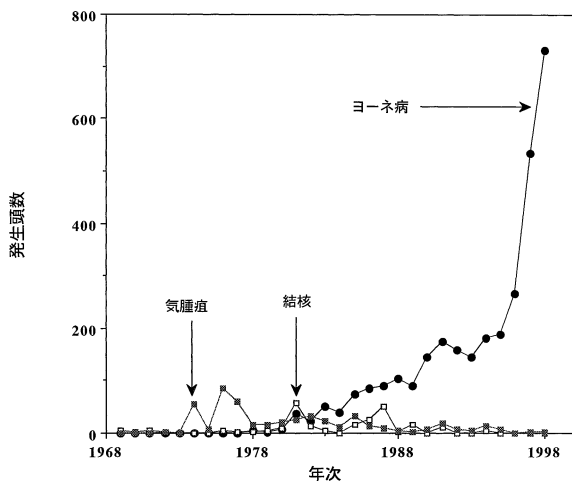


図1 北海道におけるヨーネ病等の発生状況

¹⁾ 獣医学部獣医内科学教室
Department of Veterinary Internal Medicine, Rakuno Gakuen University, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan
²⁾ 農林水産省家畜衛生試験場北海道支場
Hokkaido Research Station, National Institute of Animal Health, Sapporo, Hokkaido 062-0045, Japan
³⁾ 北海道農政部酪農畜産課
Department of Agriculture, Hokkaido Government, Sapporo, Hokkaido 060-8588, Japan

ンパク質の主要なアポリポタンパク質)の血清中濃度の測定法としてELISA法を開発した¹¹⁾。次いで、急性腸炎(サルモネラ感染症)において血清中のアポリポタンパク質A-I濃度を測定したところ、著明に減少し、その変動は病態をよく反映することが明らかになった¹²⁾。したがって、本タンパク質が腸疾患の診断上有効な検査項目になると考えられた。そこで本研究では、腸疾患の中で最重要視されているヨーネ病の診断に資するため、従来の検査法によって診断されたヨーネ病牛の血清について、アポリポタンパク質A-I濃度および各種生化学値の変動を分析し、その診断的な意義について検討した。

材料および方法

(1) 供試動物

供試牛として、北海道内の13農場で飼養されていたホルスタイン種(2~8歳、雌)68例を用いた。これらは、薬剤不耐性の水様性下痢を示した発症牛5例と特に臨床症状を示さなかった無発症牛63例に分けられた。検査材料としてこれらから直腸便と血清が採材された。なお、血清アポリポタンパク質および各種脂質成分濃度は、分娩初期とその他の乳期で差が認められるため^{11,13)}、供試牛は、いずれも分娩後1カ月以上を経過した泌乳期に属するものとした。

供試牛の糞便からのヨーネ菌の分離は、常法に従った。すなわち、糞便約1gを25mlの滅菌蒸留水に入れ、振盪器で30分間激しく混和攪拌後、1時間静置した。次いで、上清を0.7%ヘキサデシルピリジウムクロリド水和物20mlに加え混和し、一昼夜静置した。沈渣0.3mlをマイコバクチン加ハロルド培地に接種した。培養管の栓を緩めたまま斜面で1週間37°Cに保ち、表面の流動水を消失させた後、その管を密栓し、垂直に立てて3カ月間培養し、コロニーの確認された個体を陽性とした。また、血清中のELISA抗体価の検査として市販のキット(ヨーネライザー、共立商事)が用いられた。ELISA検査で陽性を示した個体については、さらに2週間後に再検査を行い陽性を示した場合、最終的に陽性個体と診断した。なお、その他は陰性とした。

供試牛は、臨床症状、糞便およびELISAの検査成績から表1に示したとおり、ヨーネ病と診断されたA~Dの4群(n=35)と健康な対照群(n=33)に分類された。なお、疾病群のうちA群は発症しており、残りのB~Dの3群は無発症であった。

表1 供試牛の概要

区分	n	発症	<i>M. paratuberculosis</i> の分離	ELISA検査	診断
A群	5	有	陽性	陽性	ヨーネ病
B群	10	無	陽性	陰性	ヨーネ病
C群	12	無	陽性	陽性	ヨーネ病
D群	8	無	陰性	陽性	ヨーネ病
対照群	33	無	陰性	陰性	健康

(2) 血清 α 1-酸性糖タンパクおよびハプトグロビン濃度の測定

α 1-酸性糖タンパク(AGP)とハプトグロビン(Hp)濃度の測定には、一元放射免疫拡散法(サイカチェック、細菌化学)を用いた。

(3) 各種の血清生化学値の測定

血清総蛋白質(TP)、アルブミン(Alb)、非エステル型脂肪酸(NEFA)、中性脂肪(TG)、総コレステロール(TC)およびリン脂質(PL)濃度は、市販のキット(テストワコー、和光純薬)で測定された。

(4) 血清アポリポタンパク質A-IおよびB-100濃度の測定

アポリポタンパク質(Apo)A-IおよびB-100濃度は、抗ウサギアポリポタンパク質抗体を用いたELISA法で測定された^{11,13)}。

(5) 統計処理

各群間の分散の分析には、Bartlettの検定を用いた。群間のデータの有意差検定として一元配置分散分析およびDunnettの検定を使用した。Hpの出現率の検定には、カイ二乗検定を用いた。なお、データは、平均値±標準偏差で表した。

成績

表2に各種の血清生化学検査値を示した。B~Dの無発症疾病群のTPとAlb濃度は、対照群のそれらと同様であった。しかし、発症していたA群におけるそれらの濃度は低下していた。NEFAおよびTG濃度は、対照群と比較してすべての無発症疾病群において上昇したが、A群ではむしろ低値を示した。一方、A~Dの疾病群のTCおよびPL濃度は、対照群のそれらと比較して、有意に減少していた。特に、A群のそれら濃度は著しい低下を示した。

AGP濃度は、A群で著明な増加が認められたが、B~D群では明らかな変化は認められなかった。Hpの出現率は、各疾病群ともに対照群と比較して有意な差が見られなかった。

図2にApoA-IとApoB-100濃度の成績を示し

た。すべての疾病群の ApoA-I 濃度は、対照群のそれと比較して有意に低下しており、特にA群において著明な低下が認められた。ApoA-I 濃度の対照群の値に対する相対濃度は、A群：63.9%，B群：86.6%，C群：89.8%そしてD群：85.8%であった。また、ApoB-100 濃度は、A群において低下したものの(73.0%)、他の群では対照群と同程度の値であった。

考 察

ウシのヨーネ病の診断および病態把握の一助とするため、脂質代謝に関連する血清成分を中心に分析しその意義について検討した。ヨーネ病において重要な臨床病理学的特徴として、低TPおよび低Alb血症（非選択性漏出型低タンパク血症）があげられている^{4,8,9,15}。しかし、これらの所見は、今回発症群の一部のみにしか当てはまらなかったことから、少なくとも無発症疾病群ではこれら項目を補助的診断に応用できないことが明らかとなった。TCおよびPL濃度は、対照群と比較していずれの疾病群においても有意に低下しており、生体が低エネルギー状態に陥っていることが推察された¹²。また、B～D群においてTG濃度の上昇が認められた。これは、同群におけるNEFA濃度の上昇に伴い、肝臓でのTG合成が増加したためと考えられた。一方、A群ではTG濃度が減少傾向を示したことから、B～D群と比べてエネルギー不足が重度に進行していることが示唆された。

急性相タンパクであるAGPとHp濃度は、ウシにおいて重度の炎症を伴うサルモネラ感染症で明らかに増加することが報告されている¹²。AGP濃度は、B～D群で特に変化が見られなかったが、A群で著明に上昇した。これは、発症に伴う病変部の炎症の程度を反映しているものと考えられた^{6,7}。また、Hpの出現率は対照群と比較していずれの疾病群においても有意な差は見られなかった。したがって、AGP濃度は、発症している個体では、ある程度診断の指標にはなるものの、無発症の疾病群では、両急性相タンパク濃度の診断的価値は極めて低いと考えられた。

ApoA-Iは、高密度リポタンパク質の主要なアポリポタンパク質であり、腸および肝臓で合成されることが知られている¹²。ニワトリヒナのコクシジウム感染症¹¹やウシのサルモネラ感染症¹²において、血清中のApoA-I濃度の低下が報告されている。A群のApoA-I濃度は、対照群のそれと比較して著明な減少を示した。また、B～Dの無発症疾病群においても有意な低下が認められた。この現象は、ヨーネ菌の感染により腸でのApoA-Iの合成が低下していることを示すと考えられた。すなわち、この腸管の機能低下は、粘膜固有層に形成された肉芽腫による乳び管腔やリンパ管の狭窄または閉塞等に起因するものと推察された⁹。上述の疾病群におけるTCおよびPL濃度の低下も腸管の機能障害による吸収低下に起因するものと考えられた¹²。無発症疾病の3群のApoA-I濃度は、各種の血清生化学値とほと

表2 ヨーネ病群および対照群における血清α1-酸性糖タンパク、ハプトグロビン濃度および各種生化学値

区分	n	NEFA (mEq/L)	TG (mg/dl)	TC (mg/dl)	PL (mg/dl)	TP (g/dl)	Alb (g/dl)	AGP (mg/ml)	Hp (mg/ml)
A群	5	0.360± 0.096	7.40± 1.50	104.6± 83.7**	120.0± 95.1**	6.68± 1.19	3.16± 0.71	0.861± 0.405**	0.614± 0.388 (3/5) #
B群	10	0.778± 0.455*	13.75± 3.77**	157.2± 81.7	169.8± 75.8	7.29± 1.30	3.51± 0.31	0.328± 0.092**	0.437± 0.634 (4/10)
C群	12	0.528± 0.240**	11.25± 2.09*	153.0± 62.8	165.5± 65.3	7.13± 0.48	3.58± 0.28	0.411± 0.224	0.706± 0.591 (5/12)
D群	8	0.455± 0.290	13.63± 4.21**	140.0± 36.0	156.9± 43.4*	7.30± 0.54	3.55± 0.25	0.598± 0.383	0.522 (2/8)
対照群	33	0.341± 0.183	9.36± 3.53	180.2± 53.5	197.2± 49.5	7.26± 0.61	3.56± 0.19	0.427± 0.184	0.662± 0.505 (10/33)

* P<0.05, ** P<0.01: 対照群との間に有意差あり。#: ()内は陽性数/nを示す。
NEFA=非エステル型脂肪酸, TG=中性脂肪, TC=総コレステロール, PL=リン脂質, TP=総タンパク質, Alb=アルブミン, AGP=α1-酸性糖タンパク, Hp=ハプトグロビン。

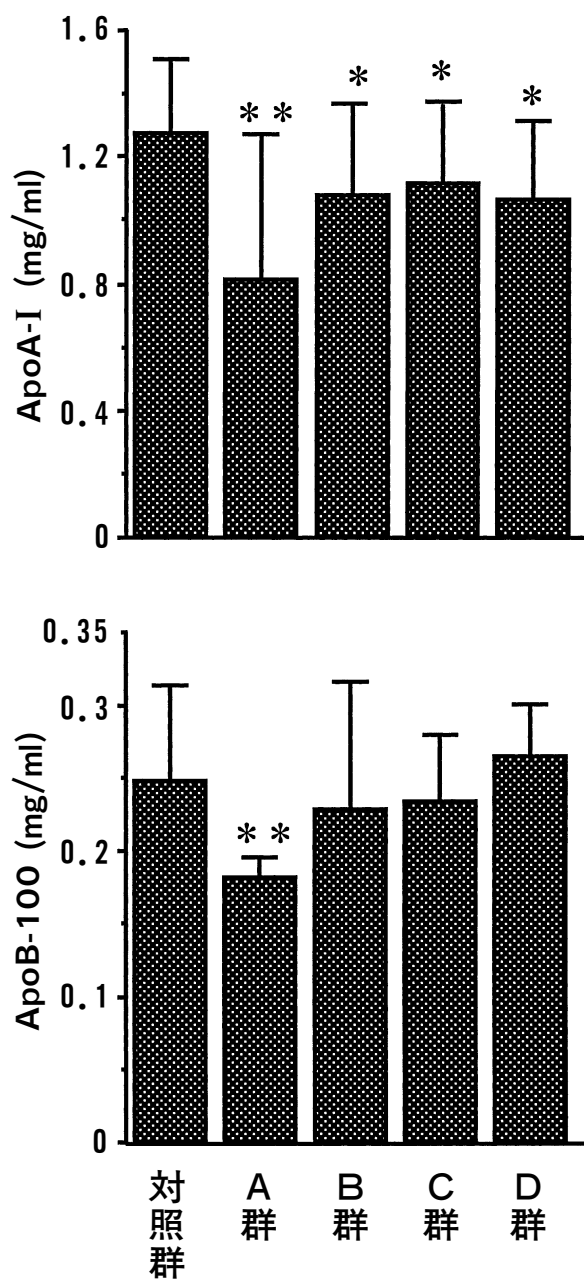


図2 ヨーネ病群および対照群における血清 ApoA-I と ApoB-100 濃度

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$: 対照群との間に有意差あり。

んど変わりがなかったことから、腸管における病変の程度も同様であったものと考えられた。

一方、B～D群の ApoB-100 濃度は、対照群のそれと同程度であった。このことは、ApoB-100 の合成がほとんど肝臓であることに起因していると考えられた^{12,13)}。しかし、A群の ApoB-100 濃度は、有意な低下を示していたことから、肝機能障害との関連性が疑われた¹³⁾。

今回検索した材料では、無発症疾病群 30 例中、ELISA と菌分離が一致したものが 40% にすぎなかったこと¹⁰⁾、また、今回成績は示さなかったが、ELISA 値と各種血清値との相関で、ApoA-I ($r = -0.345$)、TC ($r = -0.298$) そして PL ($r = -0.323$) との間に有意な負の相関が見られたものの小さな数値であったことから、本疾患の病態の把握には複数の検査が必要であることが示唆された。

結論として、無発症群での TP および Alb 濃度に先行する ApoA-I 濃度および脂質成分 (TC, PL) の低下は、その病態の程度を反映したものと考えられた。また、発症群におけるこれら濃度の著しい低下は、その病態の重篤さを示していると推察された。腸で合成され肝臓と末梢間での TC や PL の運搬に不可欠な ApoA-I は、ヨーネ病の補助的な診断として有用な血清生化学的項目となる可能性が示唆された。

要 約

ウシのヨーネ病の診断および病態把握に資するため、従来の検査法である *Mycobacterium paratuberculosis* (ヨーネ菌) の分離および ELISA 法による抗体検査によって診断されたヨーネ病牛の血清について、アポリポタンパク質 A-I (ApoA-I) 濃度を中心に分析し、その診断的意義を検討した。

供試牛 (ホルスタイン種、雌、2～8 歳) として、臨床症状、ヨーネ菌分離または ELISA 抗体検査によりヨーネ病と診断された 35 例 (発症群 $n = 5$ 、無発症群 $n = 30$) と対照として健康な牛群 33 例の計 68 例を用いた。発症群の血清総タンパク (TP) およびアルブミン (Alb) 濃度は、対照群のそれらよりも低値であったが、無発症群では変化が見られなかったことから、これら項目の診断価値は低いと考えられた。ApoA-I の濃度は、対照と比較して疾病群において有意に低値を示した。特に、発症群では著明な低下が認められた。また、疾病群の総コレステロール (TC) およびリン脂質 (PL) 濃度も同様に有意な低下を示した。無発症群は、ヨーネ菌分離と ELISA 抗体検査の成績の組み合わせによりさらに 3 群に分類して検討されたが、ApoA-I をはじめ TC と PL 濃度は各群において同様な値であった。

無発症群での血清 TP および Alb 濃度の低下に先行する ApoA-I 濃度および脂質成分 (TC, PL) の低下は、ヨーネ菌の感染による腸でのタンパク質合成能および吸収能の低下を示唆するものと考えられた。また、発症群におけるこれら濃度の著しい減

少は、その病態の重篤さを反映したものと推察された。腸で合成され、肝臓と末梢の間でのTCやPLの運搬や代謝に不可欠なるApoA-Iの濃度は、ヨーネ病の補助的な診断として有用な検査項目となる可能性が示唆された。

謝 辞

本研究は、平成10年度酪農学園大学共同研究および栗林育英学術財団より研究助成の援助を受けた。また、研究材料の採材等に御協力を頂きました北海道農政部酪農畜産課そして各家畜保健衛生所の皆様に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Allen, P. C., 1987. Effect of *Eimeria acervulina* infection on chick (*Gallus domesticus*) high density lipoprotein composition. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87B: 313-319.
- 2) 北海道農政部酪農畜産課, 1998. 平成10年家畜衛生事業成績書(北海道農政部酪農畜産課 編集), pp 151-152.
- 3) 一明秀一, 新谷英一, 早川裕一, 小前博文, 1993. 石川県における乳牛のヨーネ病の初発. *家畜診療*, 360: 19-23.
- 4) 一条茂, 1982. 牛の臨床(其田三夫 監修), pp 283-286, デーリイーマン社, 札幌.
- 5) 市川憲一, 太田俊明, 青柳高弘, 木下茂人, 山崎暉展, 徳武璋, 矢野隆良, 1989. 乳用牛にみられたヨーネ病の発生例. *臨床獣医*, 7: 38-43.
- 6) 伊藤博, 元井葎子, 田村啓二, 村田英雄, 千葉伝, 武田哲, 1989. 牛白血病における血清 α 1酸性糖蛋白とそのリンパ球幼弱化に対する影響. *日獣会誌*, 42: 39-43.
- 7) Itoh, H., K. Tamura, Y. Motoi, K. Takase and T. Nakamura, 1990. Serum α 1-acid glycoprotein in cattle with inflammatory disease and that after operation. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 52: 1293-1296.
- 8) Jones, D.G. and J.M. Kay, 1996. Serum biochemistry and the diagnosis of Johne's disease (paratuberculosis) in sheep. *Vet. Rec.*, 139: 498-499.
- 9) 百溪英一, 吉野知男, 1989. ヨーネ病の病理発生と防疫について. *日獣会誌*, 42: 229-237.
- 10) 中岡祐司, 三上祐二, 藤森則男, 山口俊昭, 山口雅紀, 藤森則男, 1998. 北海道十勝地方における牛ヨーネ病の現状と展望. 第126回日本獣医学会講演要旨集, pp 116.
- 11) Oikawa, S. and N. Katoh, 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay for apolipoprotein A-I in the serum of cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 56: 409-414.
- 12) Oikawa, S., N. Katoh, H. Itoh, H. T. Miyamoto, M. Konno and T. Kajita, 1997. Decreased serum apolipoprotein A-I concentrations in cows infected with *Salmonella* Typhimurium. *Can. J. Vet. Res.*, 61: 182-186.
- 13) Yamamoto, O., S. Oikawa and N. Katoh, 1995. Enzyme-linked immunosorbent assay for cow serum apolipoprotein B-100, a major triglyceride-transport protein. *Am. J. Vet. Res.*, 56: 1413-1417.
- 14) 横溝祐一, 1994. 遺伝子及び免疫機構の研究からヨーネ病に対する新しい診断技術開発への展開. *動生協会会報*, 27: 20-34.
- 15) 横溝祐一, 1988. 牛病学第2版(清水高正他編), pp 332-335, 近代出版, 東京.
- 16) 横溝祐一, 1985. 牛のヨーネ病について. *日獣会誌*, 38: 489-495.
- 17) 横溝祐一, 1989. ヨーネ病をさぐる. *臨床獣医*, 7: 21-31.
- 18) Yokomizo, Y., M. Kishima, Y. Mori. and K. Nishiori, 1991. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *J. Vet. Med. Sci.*, 53: 577-584.
- 19) Yoshino, K., N. Katoh, K. Takahashi and A. Yuasa, 1992. Purification of a protein from serum of cattle with hepatic lipidosis, and identification of the protein as haptoglobin. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 951-956.

Summary

Serum apolipoprotein A-I (apoA-I) concentrations were determined in cows infected with *Mycobacterium paratuberculosis* to evaluate the possible relevance of serum apoA-I in Johne's disease. ApoA-I is known to be a transporter of dietary lipids such as cholesterol and phospholipids and also an indicator of the animal's nutritional status. From 13 farms in Hokkaido, 68 lactating Holstein cows (2 to 8 years old) were included

in the study. Based on clinical symptoms, pathogen isolated in fecal samples, and/or the titer of serum antibody as determined by enzyme-linked immunosorbent assay, two study groups were formed, viz., diseased cows (n=35) and healthy controls (n=33). The group of diseased cows was further divided into symptomatic animals (n=5) and asymptomatic (n=30).

The serum concentrations of total protein and albumin were lower in diseased cows with symptoms than in the controls or in the diseased cows without symptoms. Serum apoA-I was significantly lower in the diseased cows than in the controls, and the symptomatic cows showed the more dramatic decrease. In addition, the diseased cows had low concentrations of total cholesterol and phospholipids. These decreased concentrations of total protein and albumin, of apoA-I, and of total cholesterol and phospholipids are thought to reflect the impaired intestinal absorption and the synthesis and secretion of protein and lipids in Johne's disease. We propose that serum apoA-I concentration could serve as reliable marker in evaluating the pathogenesis of intestinal dysfunction in Johne's disease.