

# 輸入めん羊におけるヨーネ病の 摘発と羊型ヨーネ菌の分離

衛藤真理子<sup>†</sup> 仙波裕信 岩田 啓 稲垣麻由子 山口賢郎

農林水産省動物検疫所検疫部 (〒235-0008 横浜市磯子区原町11-1)

(2015年12月7日受付・2016年7月5日受理)

## 要 約

ニュージーランド産めん羊の輸入検疫中に、糞便のリアルタイム PCR 検査でヨーネ病患者 1 頭を摘発し、自衛殺処分した。摘発個体の糞便から 0.03~0.163pg/2.5 $\mu$ l のヨーネ菌 DNA が検出され、回腸~盲腸と付属リンパ節から最大で 14.3pg/2.5 $\mu$ l が検出された。MGIT 液体培地を用いた臓器材料の培養検査では 6 週目から抗酸菌が認められ、ヨーネ菌 DNA 量も 200~600pg/2.5 $\mu$ l へと増加し、菌の増殖が確認された。分離株は IS1311 の RFLP 解析により羊型菌と同定された。ハロルド培地では材料の初代培養で菌は分離できず、継代培養においては 10% CO<sub>2</sub> 存在下での発育促進効果が認められた。病理学的には菌の分離部位に一致して類上皮細胞主体の肉芽腫性回腸炎が認められ、病理検査と菌分離により確実な診断ができた。めん羊のヨーネ病診断には遺伝子検査と液体培地による分離培養が高感度で有効であった。——キーワード：輸入検疫、ヨーネ病、MGIT 液体培地、リアルタイム PCR、めん羊。

-----日獣会誌 69, 678~683 (2016)

ヨーネ病は、ヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) の感染により、多くの反芻動物に慢性肉芽腫性腸炎による下痢を起こす慢性消化器感染症で、わが国では家畜伝染病に指定され、撲滅対象疾病として清浄化が進められている。本病の検査法と判定基準については、2013年4月に家畜伝染病予防法施行規則の改正が行われ、リアルタイム PCR 法 (rPCR) による糞便の遺伝子検査が法定検査として導入され、確定診断法として位置付けられた。

輸入検疫におけるヨーネ病の摘発例は 1994~2013年の過去 10 年間に患畜 4 頭と疑似患畜 149 頭の計 153 頭であるが、その約 8 割は肥育用素牛が占めている。めん羊は同時期にオーストラリアとニュージーランドから 850 頭が輸入され、12 頭 (1.4%) がヨーネ病としても抗体検査で摘発されたが、ヨーネ菌の分離には至っていない。

2013年の輸入めん羊の検疫中に、糞便材料の rPCR でヨーネ病患者 1 頭 (Lincon 種, 雄, 18 カ月齢) を摘発し自衛殺処分した。摘発個体について、病理学的検査、細菌学的検査、遺伝子学的検査を行った。

牛と比較して一般的に分離が困難な羊からのヨーネ菌

の分離培養法について、使用培地や培養条件を検討し、液体培地による初代培養で分離された菌株について、性状解析によりヨーネ菌の型別同定を行った。

## 材料及び方法

**摘発めん羊群の概要**：2013年3月にニュージーランドの 17 カ所の生産農場から展示用として輸入された 1 群のめん羊 (21 品種 44 頭) の輸入検疫を行った。全頭とも輸出国で実施されたヨーネ病の補体結合反応 (CF) と鳥型ツベルクリン (PPD) による皮内反応は陰性であった。当該めん羊群には本病を疑う下痢等臨床症状等の異常所見は認められなかった。

検疫 1 日目の糞便の rPCR で定量判定陽性の 1 頭 (No. 15) をヨーネ病患者として摘発し、隔離と畜房の消毒を行い、検疫 20 日目に自衛殺処分した。処分後に剖検、病理学的検査、培養検査等を実施した。

同一輸入群の他の個体については、検疫 1 日目の糞便の rPCR 検査で、基準値以下の DNA が検出される定性判定陽性を 1 頭認めたが、その後 3 回の継続検査ではすべて陰性であった。CF 検査で 2 頭が抗体価 5 倍の疑陽性であったが、ヨーニン検査が陰性のため健康畜と判定

<sup>†</sup> 連絡責任者：衛藤真理子 (農林水産省動物検疫所検疫部動物検疫課)

〒235-0008 横浜市磯子区原町11-1 ☎045-751-5973 FAX 045-751-5951

E-mail: aqs.yokdobutu@maff.go.jp

した。各種検査の結果、摘発個体以外は本病の感染のおそれはないものと判断して解放した。液体培地や寒天培地を用いて5カ月間実施したこれらのめん羊の糞便の培養検査において、ヨーネ菌は分離されなかった。さらに、輸入動物の解放後に仕向け先の都道府県で実施される着地検査においても、家畜保健衛生所によるrPCRが行われ、全頭陰性であることが確認された。

**免疫学的検査：**CF検査は輸入検査開始直後から約10日間隔で3回採血した経過血清で実施した。ヨーニン検査は検査5日目に接種し72時間後に判定した。

**遺伝子検査：**ヨーネ菌は特異的挿入遺伝子IS900を保有するが、近縁の*M. avium* subsp. *avium*には存在しないことが報告されており[1]、わが国でもIS900を標的遺伝子とした感度と特異性の優れたPCR法が開発され、ヨーネ菌の特異的検出と同定が行われている。

検査材料として、検査開始直後から1~3日間隔で4回採材した糞便、剖検時の腸内容物である盲腸便、結腸便、直腸便、剖検臓器材料を用いた。また、液体培地培養液中のDNA量を経時的に測定し、その変化をヨーネ菌の増殖曲線として表した。検査法については、ヨーネ病検査マニュアル2013年版「(独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所細菌寄生虫研究領域 ([http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/files/NIAH\\_yone\\_kensahou\\_130329.pdf](http://www.naro.affrc.go.jp/niah/disease/files/NIAH_yone_kensahou_130329.pdf))」に基づき実施した。DNAの抽出及び精製はヨーネ菌DNA抽出キット(ヨーネスピン、ファスマック株、神奈川)を使用し、rPCRはIS900を標的にしたプライマー(MP10-1及びMP11-1)と核酸増幅試薬(Quantitect SYBER GREEN PCR kit, QIAGEN, Germany)を用いたインターカレーション法で、リアルタイムPCR装置(7500 Real time PCR system, Applied Biosystems, U.S.A.)により実施した。判定はPCR反応後に融解曲線解析及びヨーネ菌DNA量の定量を行い、0.001pg/2.5µl以上を陽性とした。

**細菌学的検査：**糞便及び臓器乳剤検体1gを0.75% Hexadecylpyridium Chloride (HPC) で1夜37°C処理後、さらにアンホテリシンB、ナリジクス酸混合液で2日間処理した。その0.1mlを液体培地BD BACTEC MGIT Para TB Medium (以下MGIT培地)(日本ベクトンディッキンソン株、東京)と寒天培地へそれぞれ接種した[2](図1)。

液体培養は37°Cで3~5カ月間行い、その間は定期的に培養チューブ底部の蛍光センサーに365nmのUV光を照射し、継続的に蛍光強度の上昇を目視判定して菌の増殖を確認した。蛍光を発した培養液の沈渣をチール・ネルゼン(ZN)染色し、抗酸菌の増殖を確認した。さらに、培養液200µlからヨーネスピンによりDNAの抽出と精製を行い、rPCRでヨーネ菌IS900の定量を

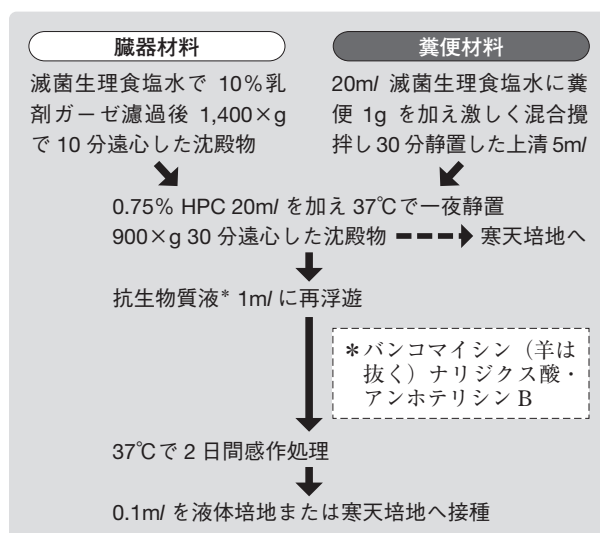


図1 ヨーネ菌の分離培養法

行った[3]。

寒天培地での培養は、マイコバクチン添加ハロルド培地(共立製薬株、東京)を用い、37°Cで5~7カ月間密栓培養してPCR法で同定した。

**分離株の継代培養条件の検討：**寒天培地での培養について、CO<sub>2</sub>存在下での培養で増殖が促進される(森ら私信)とのことから、液体培地で増殖した分離菌株の寒天培地での増殖能と10%CO<sub>2</sub>の存在が菌の増殖に及ぼす効果を調べた。

**分離株のRFLP解析：**Marshら[4]は、IS1311はヨーネ菌と*M. avium* subsp. *avium*の両方に特異的に存在するが、塩基の変異による多様性があり、PCR増幅産物の制限酵素切断パターンに亜種間のみならず株間に違いが生じることを利用して、牛由来株とめん羊由来株の区別が可能であることを報告している。分離菌株が牛型菌か羊型菌であるかの型別をするため、Marshら[4]のPCR法によりIS1311遺伝子を増幅後、PCR産物を制限酵素Hinf Iで37°C 2時間処理し、アガロース電気泳動後の切断パターンにより判定した。

**病理学的検査：**主要臓器、腸管(空腸、回腸、回盲部)及び腸管膜リンパ節を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、常法によりパラフィン標本作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色及びZN染色後に鏡検した。

## 成 績

**免疫学的検査：**摘発個体(No. 15)は、3回の経過血清によるCF検査で抗体価5倍の疑陽性であった。ヨーニン検査は接種後72時間の判定において、尾根部接種部位は硬結感を伴わないが腫脹差12mmとなり陽性であった。

**rPCRによる遺伝子検査：**検査開始直後から4回採材した糞便1gにおいて、おのおの0.54pg, 0.03pg,

表1 剖検材料から検出されたヨーネ菌 DNA 量

No.	材料部位	DNA 量	No.	材料部位	DNA 量
1	空腸	—	7	回盲リンパ	0.005
2	回腸上部	0.008	8	盲腸便	0.11
3	回腸中部	3.2	9	結腸	—
4	回腸下部	14.3	10	結腸リンパ	—
5	回腸リンパ	0.92	11	結腸便	0.45
6	盲腸	0.72	12	直腸便	0.35

10%臓器乳剤 200 $\mu$ l 及び腸内容物 1g からヨーネスピンで DNA 抽出し rPCR で検出されたヨーネ菌 DNA 量 (単位 pg/2.5 $\mu$ l) を示す。

表2 MGIT 培地による糞便の培養結果

接種材料 (採材日)	接種材料中 DNA 量	液体培地中 DNA 量	
		(培養 32 週目)	(62 週目)
糞便(3月28日)	0.54	—	—
糞便(4月4日)	0.163	0.002	0.002
糞便(4月9日)	0.08	—	—
盲腸便(剖検)	0.11	—	—
結腸便(剖検)	0.45	—	—
直腸便(剖検)	0.35	0.003	0.003

培養前接種材料及び培養後液体培地 0.2ml から rPCR で検出されたヨーネ菌 DNA 量 (単位 pg/2.5 $\mu$ l) を示し、—は検出限界以下を示す。

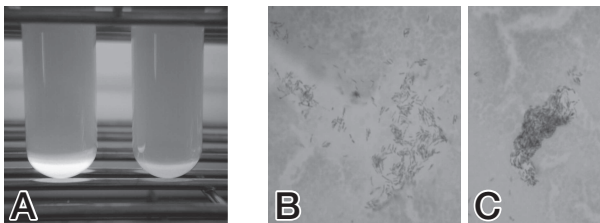


図2 MGIT 液体培地でのヨーネ菌の増殖

- A: 培養 12 週目の判定で UV 照射により蛍光を発する液体培地 (左: 陽性検体, 右: 対照)
- B, C: 培養 18 週目に培養液沈渣の ZN 染色で確認された抗酸菌の菌体及び集塊

0.82pg, 0.163pg/2.5 $\mu$ l のヨーネ菌 DNA が検出され、すべて基準値である 0.001pg/2.5 $\mu$ l 以上で陽性であることから、ヨーネ病患者と診断された。

No. 15 の剖検材料 10%乳剤 200 $\mu$ l を用いた rPCR では、全サンプルから、0.001pg/2.5 $\mu$ l 以上のヨーネ菌 DNA が検出された。回腸下部が最大量の 14.3pg/2.5 $\mu$ l を呈した。さらに、腸内容物から、0.11~0.45pg/2.5 $\mu$ l の DNA が検出された (表1)。

**細菌学的検査 (液体培地による分離培養):** 糞便及び剖検時の腸内容物の MGIT 培地での培養では 32 週目においても、液体培地中の DNA 量が生前の糞便で 0.002pg/2.5 $\mu$ l、剖検時の直腸便で 0.003pg/2.5 $\mu$ l であり、明らかな菌の増殖は確認されなかった (表2)。

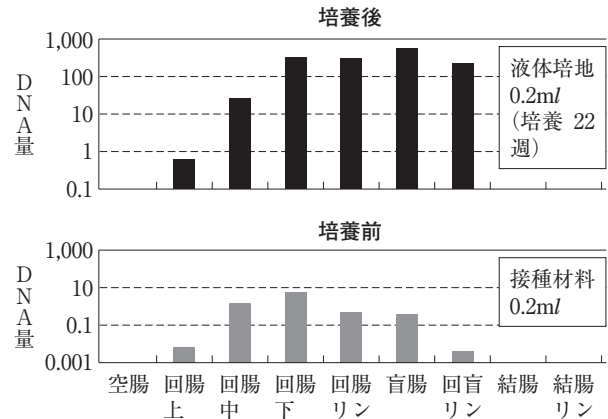


図3 MGIT 培地による臓器の培養結果

下段は培養前の接種材料 0.2ml 中の DNA 量 (単位 pg/2.5 $\mu$ l)。上段は培養 22 週目の液体培地 0.2ml 中の量を各部位ごとに示した。

(単位: pg/2.5 $\mu$ l)

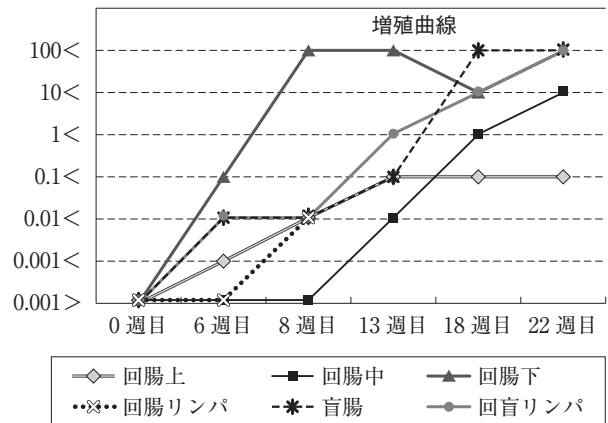


図4 液体培地中のヨーネ菌 DNA 量の経時的変化

接種材料の各部位ごとのヨーネ菌の増殖曲線を液体培地 0.2ml 中の DNA 量の経時的変化で示した。

剖検時の臓器材料を用いた MGIT 培地での培養では、培養 6 週目より培養チューブの蛍光強度が増加した (図2)。接種材料中の最大 DNA 量は 14.3pg/2.5 $\mu$ l であったが、培養 22 週目には、回腸中部・下部、盲腸、回腸及び盲腸付属リンパ節の培養液中の DNA 量は 200~600pg/2.5 $\mu$ l と顕著に増加した (図3)。

各 DNA 量は 6~13 週にかけて増加が認められた。DNA の定量から回腸下部におけるヨーネ菌の増殖が著しいことが明らかとなり、培養液中の DNA 量は 8 週目に 100pg/2.5 $\mu$ l 以上となった。回腸上部では培養後 22 週でも、DNA 量は 1pg/2.5 $\mu$ l 以下であった (図4)。

また 18 週目の培養液の沈渣には、多数の抗酸菌の集塊や菌体が認められた (図2)。

**細菌学的検査 (寒天培地による分離培養):** 糞便と剖検時の臓器材料のすべてにおいて、ハロルド寒天培地へ

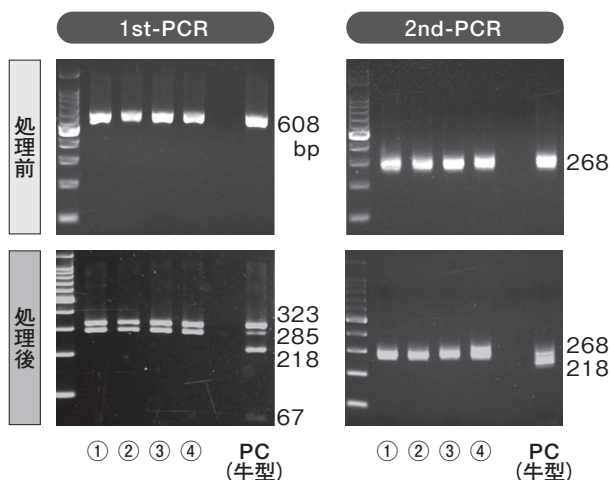


図5 分離菌株の IS1311 RFLP 解析 (*Hinf* I)  
IS1311 の PCR 産物と制限酵素 *Hinf* I 処理後の泳動図  
①回腸分離株 ②回腸リンパ分離株  
③盲腸分離株 ④回盲リンパ分離株

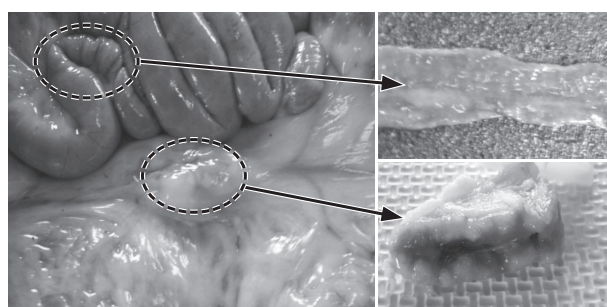


図6 腸管及び腸間膜リンパ節の剖検所見  
回腸粘膜の軽度充血と肥厚及び回腸腸間膜リンパ節の軽度腫大が認められた。

の接種ではヨーネ菌の発育は認められなかった。また、MGIT 培地で増殖したヨーネ菌分離株は 20 週間のハロルド寒天培地での継代培養で、極微小コロニーしか認めず、培地表面の DNA 量も 1.2~1.9pg/2.5 $\mu$ l と少量であった。

**継代培養法の比較：**MGIT 培地で増殖した菌をハロルド寒天培地へ継代し、10% CO<sub>2</sub> 孵卵器で 7~15 週間培養したところ、明瞭なコロニー形成が認められた。増殖株をさらにハロルド寒天培地へ 2 代目継代をすると、CO<sub>2</sub> 添加培養より劣るが、CO<sub>2</sub> 非依存性に増殖することが確認された。CO<sub>2</sub> が存在しない場合は菌の発育が遅くコロニーが小さく少ないが、寒天培地から寒天培地への継代は可能になった。

**分離株の RFLP 解析：**腸管及び腸管膜リンパ節からの分離菌株は、IS1311 遺伝子を標的とした PCR により 1st PCR で 608bp の増幅産物、2nd PCR で 268bp の増幅産物が得られた。分離菌株の 1st PCR 産物は制

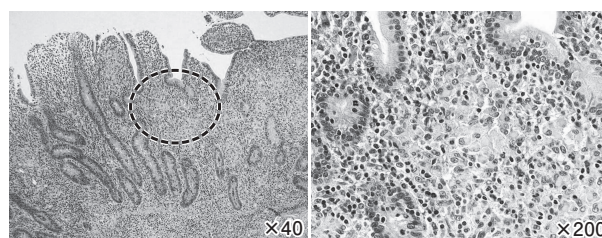


図7 回腸下部の病理組織所見 (HE)  
回腸下部の粘膜固有層に中等度の類上皮細胞浸潤が認められた。

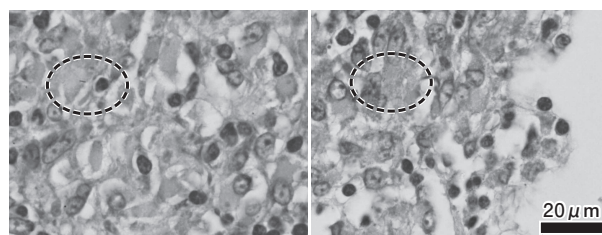


図8 回腸下部粘膜固有層の抗酸菌  
ZN 染色で回腸下部の粘膜固有層の類上皮細胞内に少数の抗酸菌が確認された。(ZN 染色  $\times$ 200)

限酵素 *Hinf* I により 1 カ所切断され 323bp と 285bp となり、対照として用いた牛型は 2 カ所で切断されて 323bp, 285bp, 218bp の断片となった。また、2nd PCR 産物は、分離株では切断されず、牛型は 1 カ所で切断されて 268bp と 218bp となった (図 5)。以上の結果から今回の分離株は羊型と判定された。

**病理学的検査：**剖検では、回腸粘膜の軽度充血及び肥厚が認められ、回腸部腸間膜リンパ節は軽度に腫大し剖面は水腫様であった (図 6)。組織所見では、回腸の粘膜上皮で軽度の脱落壊死が認められ、粘膜固有層では中等度に類上皮細胞が浸潤する部位が散見され、少数の多核巨細胞も認められた (図 7)。ZN 染色では、回腸の類上皮細胞内で少数の抗酸菌が認められた (図 8)。回腸腸間膜リンパ節では類上皮細胞の浸潤が認められ、これらの組織所見より肉芽腫性回腸炎と診断した。

## 考 察

2013 年 3 月に輸入検疫中のニュージーランド産めん羊 44 頭からヨーネ病患者 1 頭を摘発した。摘発個体は、免疫学的検査で CF 検査が抗体価 5 倍の疑陽性でヨーネン検査が陽性であったため、従来の診断法では疑似患者に区別される。しかし、新たに確定診断法として位置付けられた遺伝子検査により、糞便からヨーネ菌の DNA が継続的に検出されたことから、患者と診断された。輸入検疫における rPCR によるめん羊のヨーネ病患者の摘発は初めてであり、すでに報告 [5, 6] されている遺伝子検査の有効性が実証された。

自衛殺処分時の剖検臓器材料及び腸内容物からは

0.01~14.3pg/2.5 $\mu$ lのDNAが検出され、確定診断並びに感染部位の特定ができた。さらに、臓器材料のMGIT培地における培養結果とZN染色により、ヨーネ菌の増殖が確認された。

MGIT培地による初代分離培養において、糞便や腸内容物材料からヨーネ菌は分離されず、臓器材料からのみ分離されたことは、再現性試験でも確認できた。その理由は分からないが、臓器組織より糞便のほうが抽出された菌のDNA量が少なく菌量に差があった可能性や、培養前の抗菌剤による処理段階での生菌の活力低下等の影響が考えられる。

MGIT培地で菌の増殖が確認できた同一臓器材料をハロルド寒天培地に接種し、5カ月間以上観察しても菌の発育が認められず、牛型ヨーネ菌とは異なっていた。さらに、液体培地での分離菌株をIS1311のRFLP解析することで、羊型菌であることが確認された。固形培地を用いた初代培養で菌は発育せず、MGIT培地のみで増殖する羊型ヨーネ菌の分離はわが国の輸入検疫では初めての事例である。

従来から羊型は牛型に比べ、発育速度が非常に遅いことや、マイコバクチン添加ハロルド培地では分離できない株があることが知られ、分離培養用固形培地として、Lowenstein-Jensen (LJ) 培地や7H10MEY培地が推奨されている(横溝祐一:めん羊・山羊の特定疾病手引書(ヨーネ病),日本綿羊協会,27-41(1998))。今回これらの固形培地やハロルド培地を用いたCO<sub>2</sub>存在下での初代分離は試みていないが、MGIT培地で羊型が分離されたことから、羊型菌の初代分離における液体培地の有用性が示唆された。

牛型ヨーネ菌では、液体培地での培養2週間から菌増殖が認められ(森 康行:液体培養とリアルタイムPCRを組み合わせたヨーネ菌培養検査法,動物衛生研究所研究成果情報(2008)),固形培地より2~3週間迅速な菌分離が可能で検出率が高いことが報告されている[7-10]。しかし、今回分離された羊型株は、液体培地を用いても検出までに6~13週を要したことから、牛型より増殖速度が遅いことが示唆された。

液体培地で分離した羊型株をハロルド寒天培地で継代培養する場合、10%CO<sub>2</sub>存在下で発育の促進効果が証明された。さらに、ハロルド寒天培地にいったん発育した菌株は、CO<sub>2</sub>非依存性に継代可能となり、固形培地に次第に順化し得ると考える。

海外では、オーストラリアやニュージーランドにおける羊型菌の分離報告は多いが[4,11],わが国では牛型菌の分離が多く、羊型菌の分離事例は広島県での報告(茂木義弘ら:めん羊飼養農家における羊ヨーネ病の1例,広島県獣医学会雑誌,26,15-18(2011))に次ぐ2例目となるまれな事例である。前述のように羊型菌は分離が困難

なため報告数が少ないことも考えられ、国内における羊型ヨーネ菌の野外での感染実態は明確ではない。

羊は牛型と羊型いずれのヨーネ菌にも感染するが[11,12],培養材料の直接rPCRでヨーネ菌DNAが検出される場合、遺伝子解析により牛型か羊型かを確認し、適正な材料処理や分離培地の選択と培養条件の設定が必要と考える。

病理学的には、ヨーネ菌の分離部位に一致して、類上皮細胞の浸潤を認める肉芽腫性回腸炎であり、本病の特徴的所見が診断の裏付けとなった。なお、ZN染色で類上皮細胞内にヨーネ菌がほとんど認められなかったことは、病態としては比較的軽度であると推察された。

2010年に輸入検疫を行ったニュージーランド産アルパカでもヨーネ病の摘発事例があり、牛型ヨーネ菌が分離されている(第52回全国家畜保健衛生業績発表会講演要旨)。同国はヨーネ病発生国であるが届け出義務がなく防疫対策が不十分である。本病汚染国からの輸入動物については、糞便の遺伝子検査と培養検査による高感度で効率的な検査と的確な摘発により、本病の国内侵入防止を図ることが重要と考える。

最後に、ヨーネ病の診断と検査法について技術的助言をいただいた、動物衛生研究所細菌・寄生虫研究領域の森 康行領域長補佐及び川治聡子研究員に深謝する。

## 引用文献

- [1] Collins DM, Gabric DM, De Lisle GW: Identification of two groups of *Mycobacterium paratuberculosis* strains by restriction endonuclease analysis and DNA hybridization, *J Clin Microbiol*, 28, 1591-1596 (1990)
- [2] Stabel JR: An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three methods, *J Vet Diagn Invest*, 9, 375-380 (1997)
- [3] 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)
- [4] Marsh I, Whittington R, Cousins D: PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *Mycobacterium avium* subsp. *avium* based on polymorphisms in IS1311, *Molecular and Cellular Probes*, 13, 115-126 (1999)
- [5] Kawaji S, Taylor DL, Mori Y, Whittington RJ: 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)
- [6] Kawaji S, Begg DJ, Plain KM, Whittington RJ: A longitudinal study to evaluate the diagnostic potential of

- a direct fecal quantitative PCR test for Johne's disease in sheep, *Vet Microbiol*, 148, 35-44 (2011)
- [7] Whittington RJ : 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)
- [8] Damato JJ, Collins MT : Growth of *Mycobacterium paratuberculosis* in radiometric, Middlebrook and egg-based media, *Vet Microbiol*, 22, 31-42 (1990)
- [9] 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)
- [10] 衛藤真理子, 岩中麻里, 國保直子 : MGIT 培地による  
ヨーネ菌の迅速培養法の検討, 家畜衛生学雑誌, 28, 53-57 (2002)
- [11] Gumber S, Whittington RJ : 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, *Veterinary Microbiology*, 119, 42-52 (2007)
- [12] Collins DM, Hilbink F, West DM : Investigation of *Mycobacterium paratuberculosis* in sheep by faecal culture, DNA characterisation and the polymerase chain reaction, *Vet Rec*, 133, 599-600 (1993)

---

Detection of Johne's Disease in Imported Sheep and Isolation of Sheep Strain of  
*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

Mariko ETO<sup>†</sup>, Hironobu SENBA, Kei IWATA, Mayuko INAGAKI and Kenrou YAMAGUCHI

\*Animal Quarantine Service, 11-1 Haramachi, Isogo-ku, Yokohama, 235-0008, Japan

SUMMARY

An imported sheep from New Zealand was diagnosed with Johne's disease from a real-time PCR test of fecal samples and was culled during the import quarantine. The DNA (0.03 to 0.163 pg/2.5 $\mu$ l) of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) was detected in the feces and a maximum of 14.3 pg/2.5  $\mu$ l of DNA was detected in tissue specimens (ileum to cecum, mesenteric lymph nodes). In the bacterial cultivation of tissue samples using MGIT liquid medium, the growth of acid-fast bacteria was confirmed after 6 weeks of incubation and 200 to 600 pg/2.5  $\mu$ l of MAP DNA was detected in the medium. DNA Typing by RFLP analysis of IS1311 PCR products revealed that the isolates were ovine-type but not bovine-type. The primary culture of the bacteria was only successful using MGIT liquid medium. However, a subculture of the isolate was possible from the liquid medium to Herrold's solid medium, and the colony growth was enhanced in the presence of 10% CO<sub>2</sub>. Chronic granulomatous enteritis was observed histopathologically and such lesions were consistent with the isolated areas of the bacteria. Real-time PCR and bacterial isolation using MGIT liquid medium are highly sensitive and efficient diagnostic methods for detecting ovine Johne's disease.

— Key words : import quarantine, Johne's disease, MGIT liquid medium, real-time PCR, sheep.

<sup>†</sup> Correspondence to : Mariko ETO (Animal Quarantine Service)

11-1 Haramachi, Isogo-ku, Yokohama, 235-0008, Japan

TEL 045-751-5973 FAX 045-751-5951 E-mail : aqs.yokdobutu@maff.go.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 69, 678~683 (2016)