

## 8 ヨーネ病高度汚染農場におけるリアルタイム PCR を活用した患畜摘発事例

中央家畜保健衛生所

○石原 径佳・中井 悠華

### I はじめに

ヨーネ病は、ヨーネ菌の経口感染によっておこる、反芻動物の慢性消化器感染症であり、家畜伝染病予防法において家畜伝染病に指定されている<sup>1)</sup>。

ヨーネ病は全ての感染ステージを通じて感染牛を確実に検出できる検査法がなく<sup>2)</sup>(図1)、本病の診断には、検査精度、診断可能ステージ、検査の効率及びコストを総合的に勘案して適切な検査法を選択することが求められる。

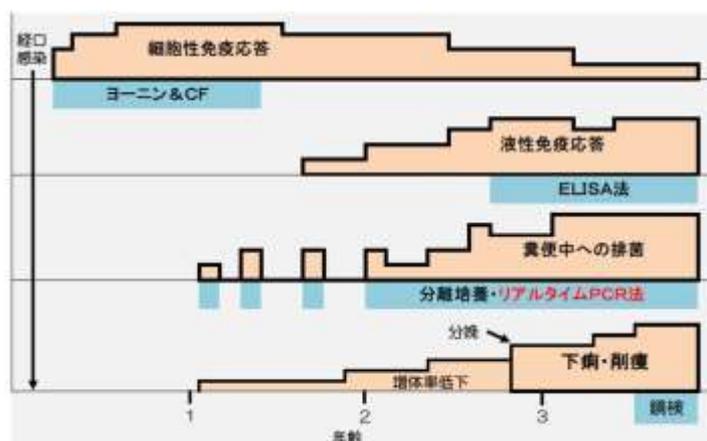


図1 ヨーネ菌感染牛における免疫応答、排菌、臨床症状の推移

平成 18 年に牛のヨーネ病防疫対策要領<sup>3)</sup>が制定され、自主とう汰の推進のため、補助的診断法として研究用試薬を用いたリアルタイム PCR 法(以下、従来法)<sup>4)</sup>が導入された。その後、平成 20 年にスクリーニング ELISA 法(以下、抗体検査)が導入され、ELISA 法の非特異反応への対応のため、平成 25 年度に家畜伝染病予防法施行規則が改正され、確定診断法にリアルタイム PCR 法(以下、公定法)が導入された。

これに伴い、本県では、埼玉県牛のヨーネ病防疫対策要領実施指針を改正し、発生確認時及びまん延防止のための同居牛検査に、スクリーニング検査として抗体検査と従来法を併用し、どちらか一方でも陽性であった場合、改めて採材し、公定法を実施する検査体制とした(図2)。

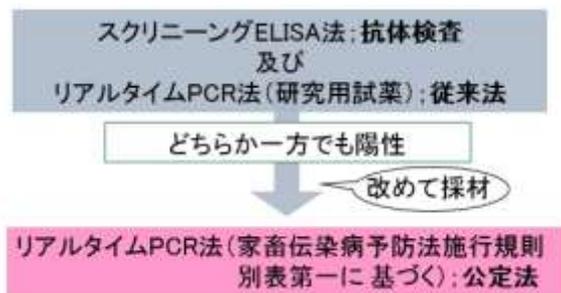


図 2 埼玉県の牛ヨーネ病防疫対策要領に基づく同居牛検査体制（平成 25 年度以降）

平成 26 年に県内肉用牛繁殖農場において、ヨーネ病発症牛 5 頭を含む計 13 頭のヨーネ病患者を摘発した<sup>5)</sup>。今回、このヨーネ病高度汚染農場において従来法を活用した清浄化対策を継続的に実施したので、その概要と、平成 27 年 9 月に新たに摘発された患者 1 頭の病性鑑定成績について報告する。

## II 農場概要及びヨーネ病摘発状況

発生農場は、肉用牛黒毛和種繁殖経営農場で、繁殖牛約 40 頭、子牛・育成牛約 30 頭を飼育していた。後継牛は、主に自家育成で確保し、子牛は離乳まで母牛と同一パドックで飼育していた。

平成 26 年 1 月に、半年前から下痢を繰り返し、削瘦がみられた繁殖牛 5 頭の病性鑑定を実施したところ、糞便から最大で  $3.32E+02pg/2.5\mu l$  のヨーネ菌遺伝子が検出され、5 頭全頭をヨーネ病と診断した。

## III 同居牛検査

### 1 材料と方法

患者摘発後直ちに、要領に基づく同居牛検査を実施した。さらに、同年 7 月、11 月、平成 27 年 3 月、8 月、11 月、平成 28 年 2 月及び 6 月に同居牛検査を実施した。

繁殖牛及び 6 か月齢以上の育成牛の直腸便・血清について、スクリーニング検査として抗体検査と従来法、確定診断法として公定法を実施した。また、環境中のヨーネ菌汚染状況の把握のため、敷料を含む環境材料の遺伝子検査も併せて実施した(表 1)。

表 1 検査材料

| 採材日    |        | 第 1 回  | 第 2 回  | 第 3 回   | 第 4 回  | 第 5 回  | 第 6 回   | 第 7 回  | 第 8 回  |
|--------|--------|--------|--------|---------|--------|--------|---------|--------|--------|
|        |        | H26. 1 | H26. 7 | H26. 11 | H27. 3 | H27. 8 | H27. 11 | H28. 2 | H28. 6 |
| 材<br>料 | 直腸便・血清 | 55     | 45     | 44      | 41     | 46     | 46      | 45     | 44     |
|        | 環境材料   | 6      | 7      | 7       | 7      | 10     | 10      | 10     | 11     |

2 結果 (図 3)

第 1 回の同居牛検査では、検査を実施した 55 頭中 3 頭が抗体検査陽性、全頭が従来法陽性となり、同居牛の平均遺伝子量は、患畜基準値 (1.00E-03pg/2.5μl) の約 1 万倍で、環境材料からも多量のヨーネ菌遺伝子が検出された。農場内が高度に汚染され、真の排菌と通過菌の区別は困難と判断し、抗体検査が陽性であった 3 頭について公定法を実施し、患畜と確定した。その後、患畜産子の自主とう汰、牛舎内の清掃・消毒及び母子分離飼育を実施した。

第 2 回の検査では、平均遺伝子量は飼養牛、環境材料ともに約 1/1000 まで減少したが、20%の牛が従来法陽性となり、環境材料からも遺伝子が検出された。通過菌の可能性も考慮し、従来法陽性牛のうち患畜基準値以上の 5 頭について、公定法を実施し、患畜と確定した。

その後、第 3, 4 回の検査では、いずれも環境材料から遺伝子が検出されたが、飼養牛の従来法陽性数は減少した。しかし、第 5 回の検査で、従来法陽性の 1 頭が公定法でも陽性となり、患畜と確定した。その後も、要領に基づき同居牛検査を実施しており、患畜の摘発はないが、従来法陽性個体や環境材料から遺伝子が検出されている。なお、抗体検査が陽性であったのは、第 1 回の検査で陽性になった 3 頭のみで、第 2 回の検査以降すべて陰性であった。

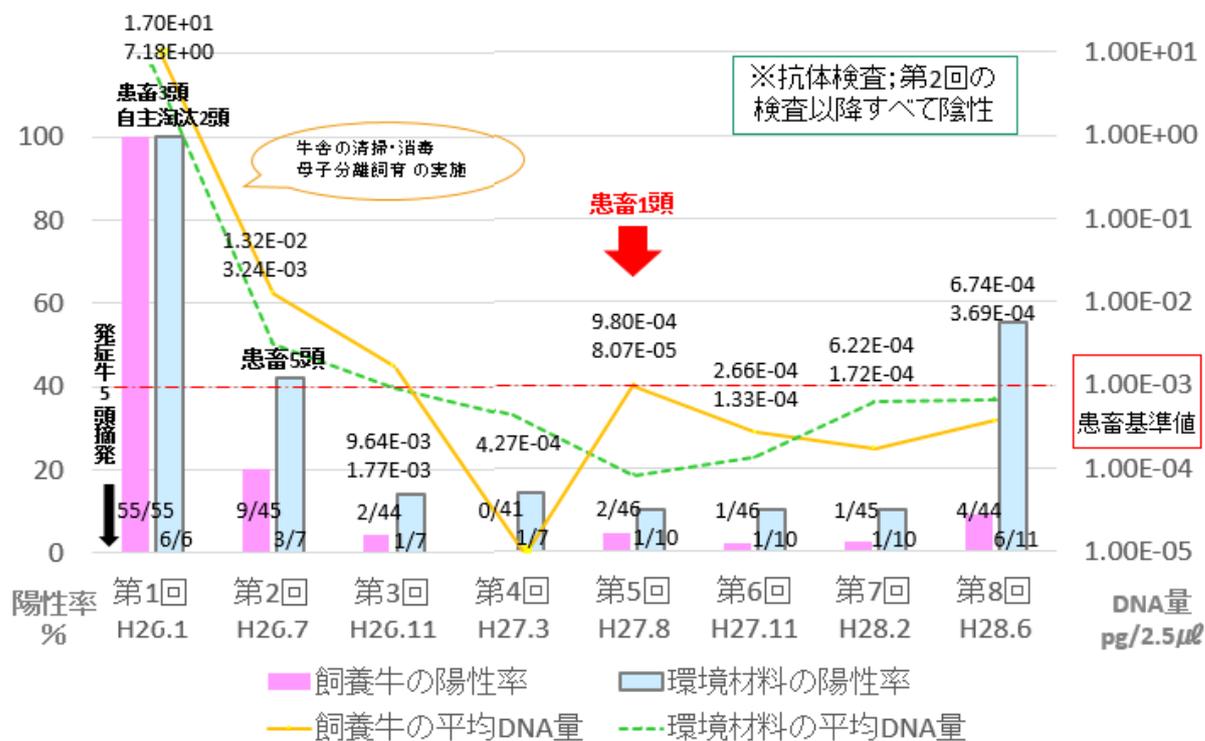


図 3 ヨーネ病リアルタイム PCR (従来法) 成績の推移

#### IV 病性鑑定

##### 1 材料と方法

平成 27 年 8 月に実施した第 5 回の同居牛検査で摘発された患畜 1 頭について病性鑑定を実施した。材料は、直腸便、腸管及びその付属リンパ節、乳房上リンパ節、胎子については主要五臓器、胎便、胎盤、羊水を用いた。解剖後、採材した材料を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、定法に従いパラフィン包埋後薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を行った。また、腸管及びその付属リンパ節については、チール・ネルゼン染色を行った。細菌学的検査は、上記材料から抽出した DNA を用いた従来法と、寒天培地 (ヨーネ菌培地、共立製薬株式会社) と液体培地 (MGIT ParaTB Medium、ベクトンディッキンソン社) を用い分離培養を実施した。

##### 2 成績

患畜は、外貌及び臨床症状に異常は認められず、剖検でも、回腸粘膜の明瞭な肥厚は認められなかった (図 4、5)。また、胎子にも異常は認められなかった。病理組織学的検査では、空腸から回腸及びその付属腸間膜リンパ節において、肉芽腫性病変が多数認められた (図 6、7)。なお、同部位のチール・ネルゼン染色では抗酸菌は認められなかった。細菌学的検査では、直腸便、腸管 (回盲部・回腸・空腸) 及びその付属リンパ節からヨーネ菌特異遺伝子が検出された。検出された遺伝子量は、病理組織学的に病変が認められた部位と一致して多く、回腸で最大 1.52pg/2.5µl であった。分離培養では、寒天培地で、検査を実施した直腸便、回腸、回腸リンパ節のすべての検体からヨーネ菌が分離された。なお、液体培地では、直腸便からはヨーネ菌は分離されなかった。培養時間は、寒天培養では 3 か月以上を要したが、液体培養では最短で 16 日で蛍光が確認されヨーネ菌の発育が確認できた (表 2)。



図 4 患畜外貌



図 5 回腸粘膜

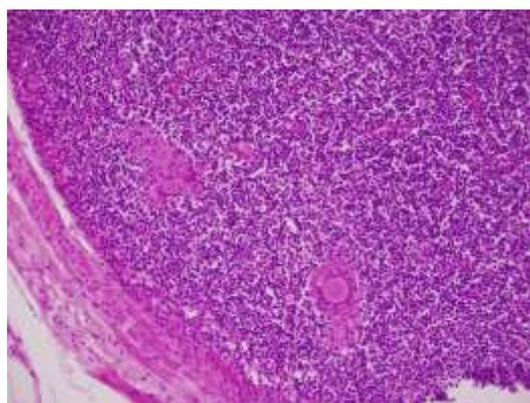
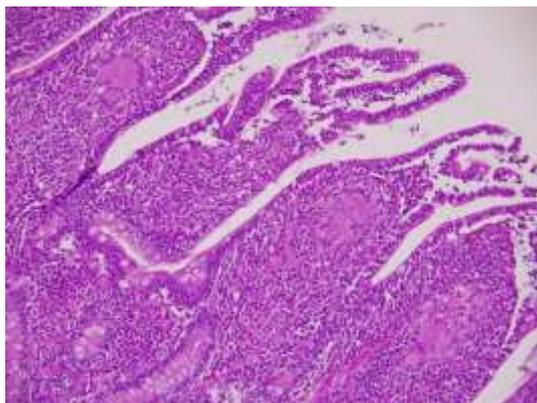


図 6 回腸粘膜弱拡大 (HE 染色)

図 7 回腸腸間膜リンパ節弱拡大 (HE 染色)

表 2 細菌学的検査成績

| 材料                 | リアルタイムPCR<br>(従来法) |                  | 分離培養 |        |             |
|--------------------|--------------------|------------------|------|--------|-------------|
|                    | 判定                 | DNA量<br>pg/2.5μl | 寒天培地 | 液体培地   | 蛍光までの<br>日数 |
| 直腸便                | +                  | 3.87E-03         | 1/0  | -      | -           |
| 回盲部                | +                  | 3.68E-01         | NT   | NT     | NT          |
| 回盲リンパ節             | -                  | ・                | NT   | NT     | NT          |
| 回腸                 | +                  | 1.52             | 3/3  | +(2/2) | 16日         |
| 回腸リンパ節             | +                  | 1.31             | 3/3  | +(2/2) | 28日         |
| 空腸                 | +                  | 2.93E-02         | NT   | NT     | NT          |
| 空腸リンパ節             | +                  | 9.65E-03         | NT   | NT     | NT          |
| 乳房上リンパ節            | -                  | ・                | NT   | NT     | NT          |
| 胎子(臓器、胎便)<br>胎盤、羊水 | -                  | ・                | NT   | NT     | NT          |

※ 分離培養(寒天培地)判定→ 0:陰性, 1:1斜面あたりのコロニー 1-10個, 2:11-99個, 3:100個以上  
NT:未実施

## V まとめと考察

平成 26 年に発症牛を含む計 13 頭のヨーネ病患者畜を摘発したヨーネ病高度汚染農場で、ヨーネ病リアルタイム PCR を活用した同居牛検査を継続して実施してきた。その中で、初発発症牛摘発から約 1 年半後の同居牛検査で、抗体陰性牛を従来法の活用により摘発し、公定法により患者畜とした。当該患者畜は、外貌や臨床症状に異常は認められず、剖検でもヨーネ病に特異的な所見は認められなかった。病理組織学的検査では、菌量が少なかったためチール・ネルゼン染色で抗酸菌は認められなかったが、ヨーネ病に特徴的な肉芽腫性病変が腸管及び付属リンパ節に認められた。細菌学的検査では、糞便、腸管及びその付属リンパ節からヨーネ菌が分離された。以上の検査成績から、当該患者畜は典型的な潜伏感染牛であったと推察された。

液体培地による培養法は寒天培地による培養法よりも分離率が良く、培養時間も短縮される<sup>6)</sup>が、今回は、液体培地では直腸便からヨーネ菌は分離されなかった。これは直腸便

中の菌量が少なく、検体中の菌量に差が生じたため考えられた。なお、培養時間は、液体培地では大幅に短縮され既報のとおりであった。

ヨーネ菌感染牛における免疫応答、排菌及び臨床症状の推移(図1)を考慮すると、抗体価上昇前に排菌が先行するため、同居牛検査で抗体検査のみを実施している場合、排菌牛を見逃す可能性が考えられる。よって、同居牛検査の際に、遺伝子検査を併用することで、抗体検査陰性の排菌牛の早期摘発が可能となり、汚染農場の清浄化を迅速に進めることが可能になる。しかし、遺伝子検査で当初から公定法を実施すると陽性と判定された段階で法的なとう汰が必要になるため、今回のように農場内にヨーネ菌を大量に排菌している感染牛が多数存在する農場での適応は難しい。従来法は、その検査結果に法的拘束力がないため、高度汚染農場で円滑に清浄化を進めるうえで有用な方法であると考えられる。

## VI 今後の対応

今後も、当該農場において、抗体検査だけではなく従来法を活用した同居牛検査を継続することで、潜伏感染牛を早期摘発し、清浄化達成を目指していきたい。

本県では、家畜伝染病予防法第5条に基づくヨーネ病の定期検査は、乳用牛についてのみ4年に1回実施していたが、平成26年度から肉用繁殖牛についても同様に定期検査を開始した。肉用繁殖牛に関しては、平成26、27年度で、県内全戸(63戸)、全頭(1326頭)の検査を実施し、全頭陰性を確認し、平成28年度からは、乳用牛と合わせて、4年に1回の検査を実施している。

抗体価上昇前に排菌が先行するというヨーネ病の特性を考慮し、今後も従来法による同居牛検査を活用しながら、ヨーネ病の清浄化を図っていく。

## VII 参考文献

- 1) 明石博臣ら編集：動物の感染症<第3版>，近代出版，116(2002)
- 2) 横溝祐一：ヨーネ病の発生状況と防疫のすすめ方，臨床獣医，7，18-26(2001)
- 3) 農林水産省・安全局：牛の防疫対策要領，平成18年11月1日公表、平成25年4月1日最終改正
- 4) 動物衛生研究所ヨーネ病研究チーム：ヨーネ病検査マニュアル，2011.1.31版
- 5) 宮田基ら：埼玉県調査研究成績報告書(家畜保健衛生業績発表集録)第56報(平成26年度)，1-7
- 6) 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)