

1 肉用牛のヨーネ病高度汚染農場におけるリアルタイムPCR法 を活用した清浄化対策

熊谷家畜保健衛生所

○宮田 基、佐竹 吉人、宮本 賢一

中央家畜保健衛生所

荒井 理恵

I はじめに

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（図1）、本病の診断には、検査精度、診断可能ステージと検査の効率及びコストを総合的に勘案することが求められる。

本菌の高度汚染農場では、非感染牛も遺伝子検査陽性となる可能性があるが、リアルタイムPCR法は、特異性、迅速性に優れており、従来の検査法では診断が困難な早期の感染牛の摘発に有用である。

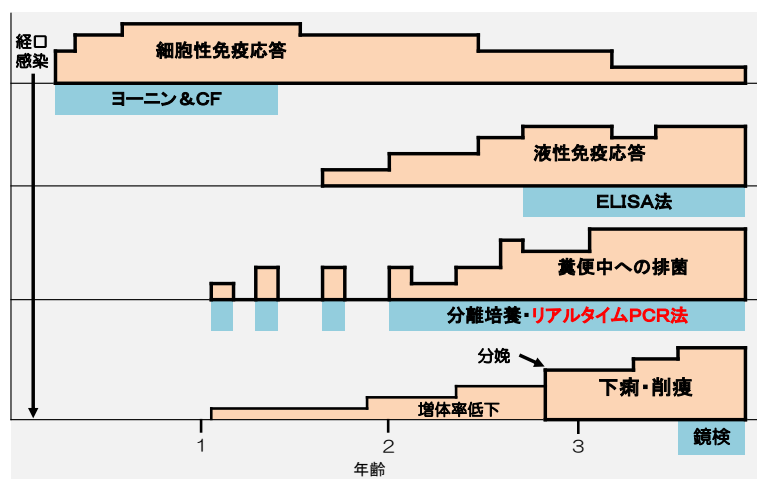


図1 初生期にヨーネ菌に感染した牛の免疫応答推移、排菌、臨床症状のモデルと各種検査法³⁾

平成18年に牛のヨーネ病防疫対策要領（以下、「要領」という。）¹⁾が制定され、自主とう汰の推進のため、補助的検査法として安価な研究用試薬を用いたリアルタイムPCR法（以下、「従来法」という。）²⁾が導入された。その後、ELISA法の非特異反応への対応のため、平成20年にスクリーニング検査が、平成25年度の家畜伝染病予防法施行規則等の改正により、確定検査にリアルタイムPCR法（以下、「公定法」という。）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等を改正し、発生確認農場におけるまん延防止のための同居牛検査のスクリーニング検査にヨーネ病スクリーニングELISA法（以下、「ELISA法」という。）と従来法を併用する検査体制とした（図2）。

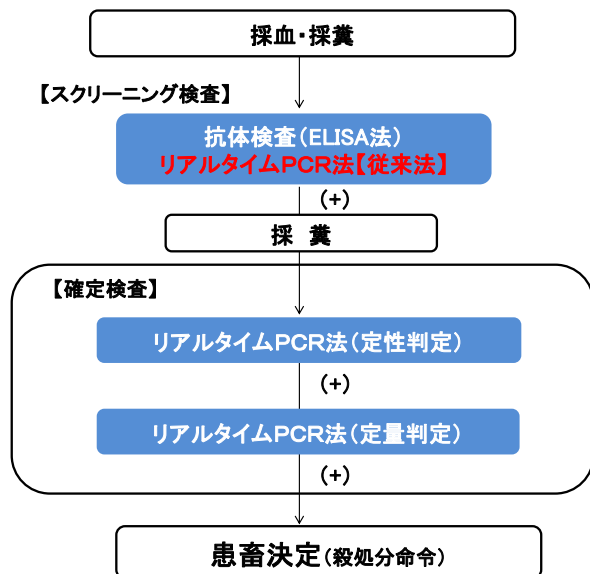


図2 埼玉県の牛ヨーネ病防疫対策要領に基づく同居牛検査(平成 25 年度以降)

今回、県内で確認された肉用牛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実施したのでその概要を報告する。

II 農家概要

発生農場は黒毛和種繁殖経営で、繁殖牛約 40 頭、子牛・育成牛 30 頭を飼育している。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、10 ヶ月齢で県内の家畜市場に出荷している (図 3)。

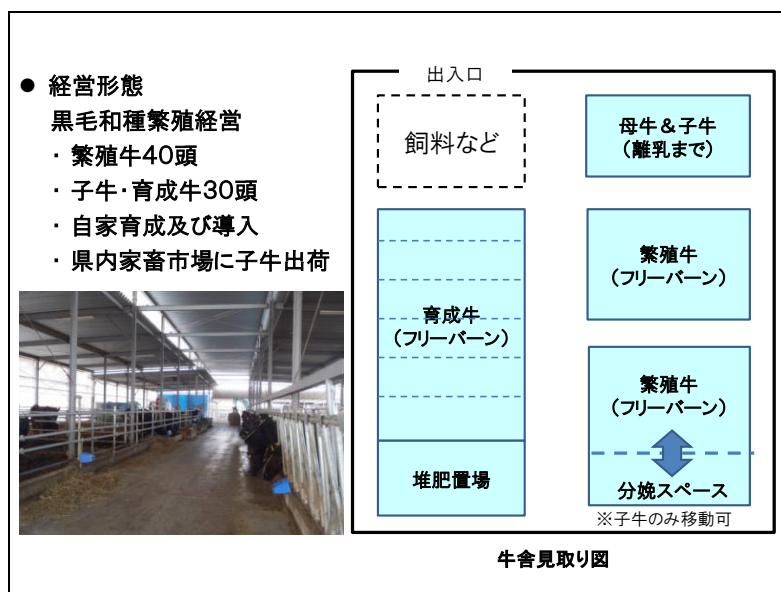


図3 農家概要

III 病性鑑定

平成 26 年 1 月 6 日に、繁殖牛数頭が慢性の下痢及び消瘦を呈しているとの通報があり、当該農場の病性鑑定を実施し、立入時に下痢・消瘦(図 4)を呈していた 5 頭の直腸便・血清を材料した。



図4 発症牛

臨床症状等からヨーネ病を疑ったため、ELISA 法及び公定法による検査を実施した結果、ELISA 法で 3 頭が陽性、公定法で全頭が陽性となり、5 頭全てがヨーネ病患者と確定した。

ELISA 法で陽性となった 3 頭は、DNA 量が $1.68E+02\text{pg}/2.5\mu\text{l}$ ~ $3.32E+02\text{pg}/2.5\mu\text{l}$ と非常に多い大量排菌牛だった(表 1)。

表1 病性鑑定成績

No.	年齢	症状	スクリーニングELISA法 陽性:ELISA値 $0.3 \leq$	リアルタイムPCR(公定法)	
				定性判定	定量判定 (DNA量 $\text{pg}/2.5\mu\text{l}$) 陽性: $1.00-0.3 \leq$
1	12歳	消瘦	+	+	+(3.32E+02)
2	17歳	消瘦	-	+	+(1.39E-01)
3	17歳	消瘦	+	+	+(1.68E+02)
4	13歳	消瘦	-	+	+(8.28E-03)
5	3歳	消瘦・軟便 起立不能	+	+	+(2.88E+02)

IV 同居牛検査

1 材料と方法

患畜の摘発を受け、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 月及び平成 27 年 3 月に検査を実施した(表 2)。

表 2 検査材料

採材日		第 1 回 (1/15)	第 2 回 (7/22)	第 3 回 (11/10)	第 4 回 (3/2)
材料 (検体数)	直腸便・血清	5 5	4 5	4 4	4 1
	環境材料	6	7	7	7

繁殖牛及び6ヵ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ELISA法と従来法、確定検査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を把握するため、敷料の検査を実施した。

2 成績

(1) 第1回検査

ア 検査成績

ELISA法では55頭中3頭が陽性、従来法では55頭全頭が陽性となり、うち53頭のDNA量は、公定法で陽性となる $1.00E-03$ pg/2.5 μ l以上であった。

また、敷料も6検体全てが陽性で、うち5検体のDNA量は $10\sim 1$ pg/2.5 μ lと非常に多く、大量排菌牛の存在により環境中が高度に汚染されていた。

そのため、多くの個体は環境中のヨーネ菌の影響により従来法で陽性となっていると判断し、ELISA法で陽性の3頭のみ、公定法を実施し患畜と確定した。

なお、患畜はいずれも自家産(6歳、3歳、3歳)であった。

イ 防疫対応と指導

病性鑑定及び1回目の同居牛検査成績より、当該農場はヨーネ菌の大量排菌牛が存在する高度汚染農場であることが判明した。

そこで、牛群から患畜を隔離・法令殺した後、環境中の汚染度を低下させるため、牛舎等の徹底的な除糞・清掃・洗浄・消毒を指導するとともに、新たに飼槽を設置した(図5、図6、図7)。

なお、洗浄・消毒については、当所職員も支援を行った。



図5 牛舎の清掃・洗浄・消毒作業



図6 石灰乳を塗布した牛舎



図7 新たに設置した飼槽

その他、感染・排菌している可能性が高い患畜の産子2頭を自主とう汰し、母乳及び母牛からの感染のリスクを低減させるため、新生子牛は出生直後に分離し(図8)、人工乳を給与(図9)することとした。



図8 分離飼育した子牛



図9 人工乳の給与に変更

子牛の出荷は、発生前の家畜市場への出荷から肥育農家2戸に限定した相対取引に変更し、検査実施後に出荷した。

また、今回の発生前の出荷牛については、出荷先12農場の追跡調査を実施し、繁殖農場3戸は繁殖牛4頭についてスクリーニング検査を実施し農場の陰性を確認、肥育農場9戸は全て肥育向けであることを確認した。

(2) 第2回検査

ア ELISA法では45頭全頭が陰性となり、従来法では、45頭中9頭が陽性となった。

敷料は7検体中3検体が陽性となり、DNA量は $5.79E-04$ から $5.37E-03$ pg/2.5 μ lと低下していた。環境中のヨーネ菌の影響を考慮し、従来法陽性牛のうち公定法の判定基準であるDNA量

1.00E-03 pg/2.5μl以上の5頭について、公定法を実施し患畜と決定した。患畜の1頭(10歳)は導入牛で、その他4頭(2歳、9ヶ月齢、7ヶ月齢、7ヵ月齢)は自家産であった。

また、患畜5頭は精密検査により、全頭ヨーネ菌感染が確認された。

(3) 第3回検査

ELISA法では44頭全頭が陰性、従来法では44頭中2頭が陽性となった。陽性牛2頭について公定法を実施したが、2頭とも健康畜と判定された。敷料は1検体のみ陽性であった。

なお、この2頭と同居繁殖牛3頭、子牛9頭について、細胞性免疫応答の検査法であるINF-γ検査及びIL-10検査⁴⁾を実施したところ、感染している可能性が低いことが確認された。

(4) 第4回検査

ELISA法及び従来法では41頭全頭が陰性で、敷料は1検体のみ陽性であった。

V まとめと考察

本農場は、牛群内に大量排菌牛が存在し、農場環境のDNA量も極めて高いヨーネ病高度汚染農場であった。

初回の同居牛検査では、55頭全頭が従来法陽性となり、うち53頭のDNA量が公定法で陽性となる1.00E-03 pg/2.5μlを大幅に超過していたことから、環境中のヨーネ菌の影響が強く示唆された。

患畜13頭の摘発・とう汰と2頭の自主とう汰、牛舎の洗浄・消毒を繰り返し実施した結果、当初は従来法で100%陽性だったが、2回目20%、3回目5%、4回目0%と環境中のヨーネ菌の影響を排除することができた(図10)。

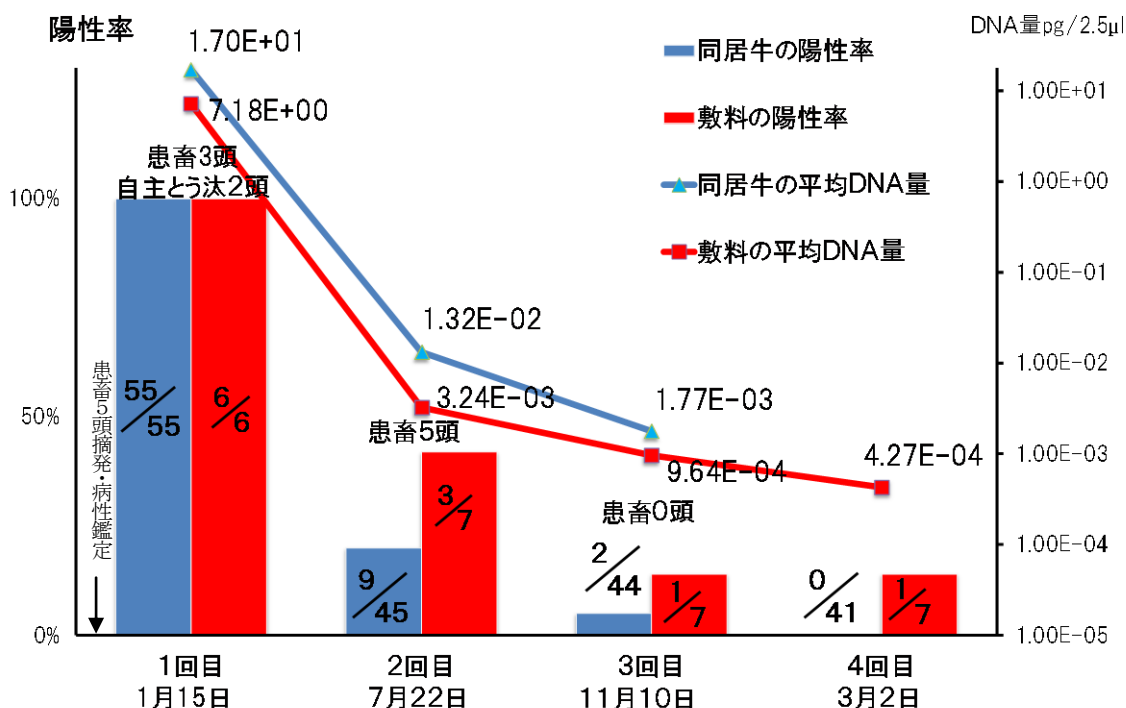


図10 ヨーネ病リアルタイムPCR法(従来法)成績の推移

また、子牛の飼養衛生管理も見直し、新生子牛を出生直後に母牛から早期分離し、人工乳を給与することとし、ヨーネ菌の感染リスクが高い6カ月齢以下の幼齢牛の感染を防止することが可能となった。

公定法は通過菌の影響を大きく受けるにも関わらず、その結果に法的拘束力を伴うため、その検査には慎重さが求められる。公定法が導入されるまで、本県を含む多くの都道府県でカテゴリーⅡ農場の同居牛検査に用いられた従来法は、その結果に法的拘束力がなく、従来法によるスクリーニング検査を実施し、飼養環境の清浄化を図ることにより、通過菌等の影響により陽性となった非感染牛を患畜として摘発する事態を回避できる。また、抗体検査で陰性の感染牛に対する早期摘発が可能で、高度汚染農場の清浄化を迅速に進めることができると考えられる。

VI 今後の対応

今後、当該農場において、従来法を活用した検査を継続することにより、清浄化を迅速に達成するとともに、本事例を高度汚染農場の清浄化モデルケースとしたい。

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。

さらに、肉用繁殖牛について未実施であったことと、本事例の発生を受けたことにより、県内のヨーネ病浸潤状況を把握するため、27年度までに全戸(63戸)・全頭(1131頭)の検査を実施することとし、これまでに38戸(60%)・642頭(57%)の検査を実施し全頭陰性を確認している。

引き続き、発生農場における清浄化対策と、定期検査による患畜の早期摘発により、牛ヨーネ病の清浄化を図っていく。

VI 参考文献

- 1) 牛の防疫対策要領(農林水産省消費・安全局、平成18年11月1日公表、平成25年4月1日最終改正)
- 2) ヨーネ病検査マニュアル2011.1.31版(動物衛生研究所ヨーネ病研究チーム)
- 3) 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)
- 4) 抗インターロイキン10抗体を用いた牛ヨーネ病のインターフェロンガンマELISA診断法の高感度化(2003年、動物衛生研究所ヨーネ病・炎症性腸管疾患研究チーム)