

10 リアルタイム PCR 法による乳用牛のヨーネ病自主とう汰事例

熊谷家畜保健衛生所

○向井 海渡・宮本 賢一・佐竹 吉人

中央家畜保健衛生所

荒井 理恵・平野 晃司

I はじめに

家畜伝染病予防法の改正により、平成 25 年度から、ヨーネ病の確定診断法として新たにリアルタイム PCR 法が導入された¹⁾。本法では、定性判定として糞便中のヨーネ菌 DNA を検出し、さらに定量判定として DNA 量を測定することにより、患畜の判定が行われる。そのため、ヨーネ菌 DNA が検出される（定性判定陽性）にも関わらず、その値が定量判定の基準値（ $1.00E-03\text{pg}/2.5\mu\text{l}$ ）以下（定量判定陰性）であれば、当該牛は家畜伝染病予防法では、健康畜となる。

平成 26 年 4 月、平成 20 年度以降にヨーネ病患畜 9 頭が摘発されている管内一酪農家の同居牛検査²⁾において、成牛 1 頭がスクリーニング検査で陽性となった³⁾。その後のリアルタイム PCR 法において定性判定陽性、定量判定陰性となり、健康畜と判定されたが、本病の清浄化を図るため、当該牛を自主とう汰し、病性鑑定を行ったのでその概要を報告する。

II 発生概要

1 農場概要

当該農場は成牛 60 頭、育成牛 5 頭を飼養する酪農経営である。飼育牛は、38 頭が自家産で、23 頭が北海道、残り 4 頭が埼玉県内からの導入牛であった。飼養形態は、成牛がフリーストールとフリーバーン、育成牛が単房式の牛舎である（図 1）。当該農場では、平成 20 年度以降、ヨーネ病患畜を 9 頭摘発するとともに、1 頭を自主とう汰している。なお、これらの牛は全て自家産であった。

2 発生概要

平成 26 年 4 月 17 日に 65 頭の同居牛検査を実施したところ、成牛 1 頭がスクリーニング検査で陽性となり、リアルタイム PCR 法で定性判定陽性、定量判定陰性となった。なお、定量判定の DNA 量は $7.47E-04\text{pg}/2.5\mu\text{l}$ であった。

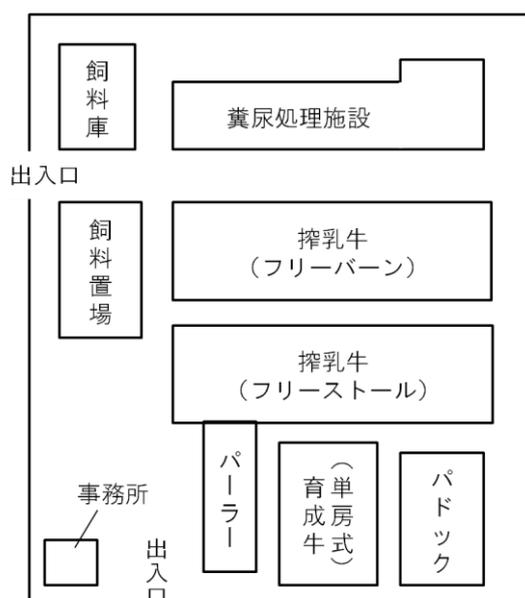


図 1 農場見取り図

当該牛には水様性下痢や削瘦は認められなかったが、平成 18 年 6 月生まれの自家産であること、平成 25 年 2 月に実施した検査でも糞便中からヨーネ菌 DNA が検出され、DNA 量も $1.94E-04\text{pg}/2.5\mu\text{l}$ であったことから、間欠的に排菌をしているハイリスク牛と判断し、平成 26 年 5 月 28 日に自主とう汰をした。

III 材料及び方法

1 病理学的検査

自主とう汰牛を剖検し、主要臓器についてヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色とチール・ネルゼン染色による病理組織学的検査を行った。

2 細菌学的検査

ヨーネ病検査マニュアルに定められた腸管及びリンパ節に加え、肝臓、脾臓および腎臓などの主要臓器と乳汁、直腸便を材料として、液体培地 (BD BACTEC MGIT ParaTB Medium) (好気培養、2 ヶ月間) と寒天培地 (7H10MEY 培地) (好気培養、3 ヶ月間以上) を用いた細菌分離を実施した。また、同材料について研究用試薬 (QuantiTect SYBR Green PCR Kit、Cat. No. : 204143 (キアゲン社)) を用いてリアルタイム PCR 法を実施した。

IV 成績

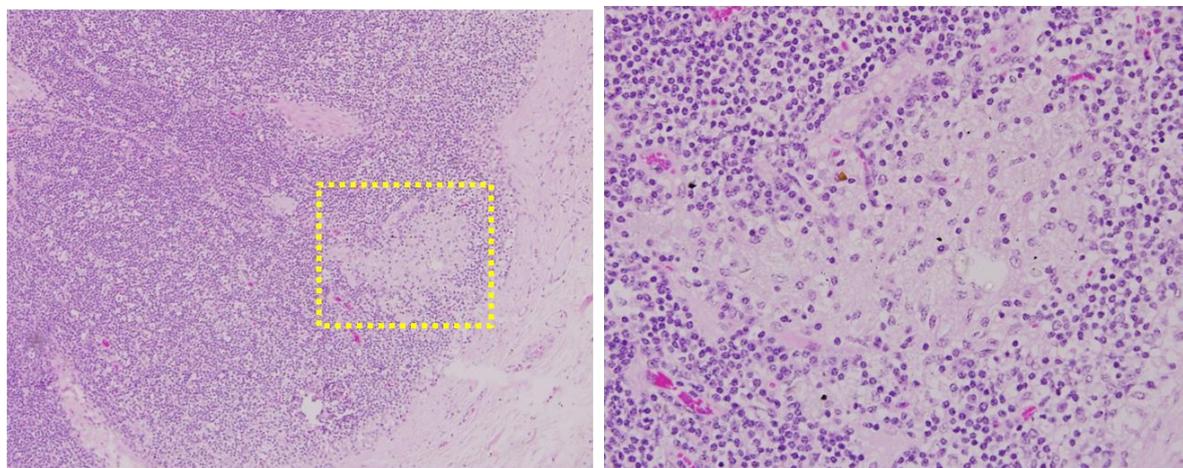
1 病理学的検査成績

(1) 剖検所見

有意な所見は認められなかった。

(2) 病理組織学的検査

HE 染色において、空腸部腸間膜リンパ節、回腸部腸間膜リンパ節、回腸 (回盲部から 10cm の部位) でヨーネ病の特徴的病変である、類上皮細胞主体の肉芽腫性炎が確認された (図 2、3)。しかし、チール・ネルゼン染色では、これら肉芽腫性炎が確認された部位に好酸菌を確認できなかった。⁵⁾



回腸部腸間膜リンパ節 (HE染色) 【弱拡大】

回腸部腸間膜リンパ節 (HE染色) 【強拡大】

図 2. 回腸部腸間膜リンパ節で認められた肉芽腫性炎

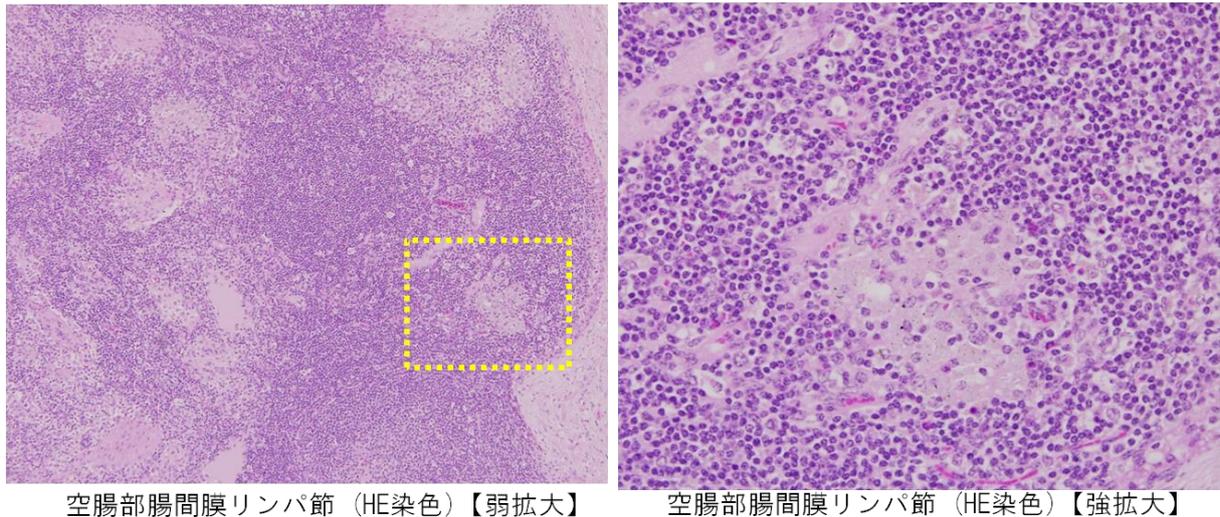


図 3. 空腸部腸間膜リンパ節で確認された肉芽腫性炎

2 細菌学的検査成績

リアルタイム PCR 法では、空腸、回腸、盲腸および結腸など腸管の多くの部位、直腸便および空腸部・回腸部腸間膜リンパ節からヨーネ菌 DNA が検出された。また、盲腸を除くこれらの部位からは、液体培地と寒天培地によりヨーネ菌が分離された。ヨーネ菌 DNA が多く検出された回盲部から 50 センチの部位や、空腸（パイエル板が肥厚した部位）および空腸・回腸部腸間膜リンパ節などの部位は、液体培地での蛍光検出までにかかった日数が短く、また寒天培地では確認されたコロニー数が多い傾向がみられた（表 1, 2）。なお、主要臓器、乳房リンパ節および乳汁については、リアルタイム PCR 法でヨーネ菌 DNA は検出されず、またヨーネ菌は分離されなかった。

表 1. 消化管、直腸便を材料とした細菌学的検査結果

部位	液体培地		寒天培地	リアルタイムPCR法	
	判定 (well)	蛍光検出 までの日数	判定※	判定 (well)	DNA量 [pg/2.5 μl]
十二指腸	-		0	-	
空腸 (パイエル板の明瞭な部位)	+ (2/2)	44	1	+ (2/4)	6.09E-04
空腸 (パイエル板が肥厚した部位)	+ (2/2)	19	3	+ (2/2)	3.21E-01
回盲部から1m	-		0	-	
回盲部から50cm	+ (2/2)	37	1	+ (2/2)	4.21E-01
回盲部から30cm	-		0	-	
回腸末端部	+ (2/2)	44	0	+ (1/2)	8.36E-04
盲腸	-		0	+ (1/2)	1.22E-04
結腸	+ (2/2)	55	1	+ (1/4)	2.58E-04
直腸便	+ (2/2)	48	1	+ (2/2)	2.29E-03

※寒天培地の判定(コロニー数/斜面) 0: 陰性 1:1-10個 2:11-99個 3:100個以上

表 2. 腸間膜リンパ節、回盲部を材料とした細菌学的検査結果

部位	液体培地		寒天培地	リアルタイムPCR法	
	判定 (well)	蛍光検出 までの日数	判定	判定 (well)	DNA量 [pg/2.5 μl]
空腸部腸間膜(上)	+ (1/2)	55	0	+ (1/4)	2.23E-04
空腸部腸間膜(中)	+ (2/2)	30	3	+ (2/2)	2.45E-01
空腸部腸間膜(下)	+ (2/2)	37	2	+ (2/2)	4.76E-03
回腸部腸間膜(上)	+ (2/2)	37	2	+ (2/2)	5.42E-03
回腸部腸間膜(中)	+ (2/2)	30	1	+ (2/2)	1.50E-01
回腸部腸間膜(下)	+ (1/2)	55	0	+ (2/2)	2.27E-04
回盲部	+ (1/2)	48	1	- (0/4)	

V まとめおよび考察

今回、リアルタイム PCR 法で定性判定陽性、定量判定陰性となり、健康畜と判定された牛を自主とう汰し、病性鑑定を実施した結果、病理組織学的検査において回腸や腸間膜リンパ節にヨーネ病の特徴的病変が認められた。また、細菌学的検査では腸粘膜や腸間膜リンパ節及び直腸便からヨーネ菌 DNA が検出され、これらの部位からはヨーネ菌も分離された。これにより当該牛はヨーネ菌感染牛であることが明らかとなった。

以上のことから、リアルタイム PCR 法で定性判定陽性、定量判定陰性となった牛は、患畜とはならないが、潜在的なヨーネ病感染牛である可能性があると考えられる。一方で、環境がヨーネ菌で高度に汚染された農場では、環境中のヨーネ菌によるリアルタイム PCR 法陽性の事例もあることから、定性判定陽性、定量判定陰性となった牛においても、個体や農家の状況を考慮した上で自主とう汰を実施することが、ヨーネ病清浄化に重要であると考えられる。今回の症例により、ヨーネ病発生農場に対して清浄化対策の一環として自主とう汰を指導する際の有用な知見が得られた。

VI 参考文献

- 1) (独立行政法人) 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 (ヨーネ病), ヨーネ病検査マニュアル, 2013 年版, 2-3
- 2) 埼玉県, 埼玉県牛のヨーネ病防疫対策要領実施指針, 平成 25 年 4 月 1 日一部改正
- 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) 板倉智敏・後藤直彰, 文永堂出版, 獣医病理組織カラーアトラス, 72