

## 9年ぶりに2農場で摘発されたヨーネ病事例について

県央家畜保健衛生所

猪瀬 早紀      矢島 真紀子  
伊藤 咲        近内 将記  
小菅 千恵子    仲澤 浩江  
英 俊征

### はじめに

ヨーネ病は、マイコバクテリウム属菌である *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (以下、ヨーネ菌) を経口摂取することにより感染し、反すう動物に慢性の頑固な下痢、泌乳量の低下及び消瘦等を引き起こす疾病である<sup>1)</sup>。

本疾病は家畜伝染病予防法(以下、法)の家畜伝染病に指定され、全国で年間約1,000頭程度の発生があるが、県内農場では平成25年以降、約9年間発生がなかった。疾病予防対策として疾病発生地域との交流を避けることが挙げられるが、本県では牛の飼養管理の性質上、預託等の県外飼養を避けられず、常に県外からのヨーネ菌の持ち込みの危険性は高い状況にある。感染牛は無症状のまま推移し、一部が数年後に感染源となるため、定期的なサーベイランス検査と、患畜確認時のまん延防止対策が重要となる。

本県では、牛のヨーネ病の検査体制として、法5条に基づく2年に1回のサーベイランス検査(ヨーネライザ・スクリーニングKS(共立製薬㈱)による抗体検査)を実施し、リアルタイムPCR法による検査(ヨーネジーン・KS(共立製薬㈱))により患畜を確認した場合は、患畜の精密検査及び患畜確認時の検査を実施する。患畜確認時の検査やその後のまん延防止のための検査では、農林水産省の定める牛のヨーネ病防疫対策要領<sup>2)</sup>では抗体検査、培養検査または遺伝子検査と規定されているところ、本県では県運用方針にて全頭の遺伝子検査(リアルタイムPCR法)を規定し、実施している。

今回、県内2農場(A・B)において牛のヨーネ病患畜を摘発、清浄化したので、その概要について報告する。

## 発生の概要

発生農場Aは、乳用牛32頭、肉用牛8頭、山羊25頭等を飼養する教育機関附属農場である。法5条に基づくサーベイランス検査を令和4年5月に実施したところ、1頭が抗体陽性となった。続けて、確定検査となる糞便のリアルタイムPCR法（ヨーネジーン・KS（共立製薬㈱）によるqPCR検査。以下、qPCR）を実施したところ、ヨーネ菌DNA量が0.003pg/2.5 $\mu$ lとなり、ヨーネ病患者と決定された（以下、患者a）。

発生農場Bは、乳用牛48頭、肉用牛11頭を飼養する酪農場である。法5条に基づくサーベイランス検査を令和4年12月に実施したところ、1頭が抗体陽性となった。続けて、糞便のqPCRを実施したところ、ヨーネ菌DNA量が0.002pg/2.5 $\mu$ lとなり、ヨーネ病患者と決定された（以下、患者b）。

## 材料と方法

### 1 材料

患者aは、65 か月齢の肉用繁殖牛であり、臨床症状はなく、10 か月齢で県外農場から導入し、平成30年度のサーベイランス検査では抗体陰性であった。

患者bは、63 か月齢の搾乳牛であり、臨床症状はなく、県外預託歴があり、令和2年度のサーベイランス検査では抗体陰性であった。

患者a及びbについて病理学的検査及び細菌学的検査を実施した。

### 2 方法

#### (1) 病理学的検査

##### ア 病理解剖学的検査

患者a及びbについて、外貌検査及び剖検を実施した。

##### イ 病理組織学的検査

患者aでは、空腸、回盲部より1m上・50cm上・30cm上・10cm上、回盲部、盲腸、結腸、空腸部・回腸部腸間膜リンパ節、回盲リンパ節及び、盲腸リンパ節について、患者bでは空腸、回盲部より1m上・50cm上・30cm上・10cm上、回盲部、盲腸、結腸、空腸部・回腸部腸間膜リンパ節、回盲リンパ節、盲腸リンパ節及び、乳房上リンパ節について採材し、10%中性緩衝ホルマ

リン液で固定後、常法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン染色及び抗酸菌染色を実施した。

## (2) 細菌学的検査

患畜 a では、空腸、回盲部より 1m 上・50 cm 上・30 cm 上・10 cm 上、回盲部、盲腸、結腸、空腸部・回腸部腸間膜リンパ節、回盲リンパ節及び、盲腸リンパ節について、患畜 b では空腸、回盲部より 1m 上・50 cm 上・30 cm 上・10 cm 上、回盲部、盲腸、結腸、空腸部・回腸部腸間膜リンパ節、回盲リンパ節、盲腸リンパ節及び、乳房上リンパ節について採材し、ヨーネ病検査マニュアル<sup>3)</sup>に基づき、液体培地 (BD BACTEC MGIT Para TB Medium<sup>®</sup> (ベクトン・ディッキントン(株))) 及び、寒天培地 (ヨーネ菌用培地「共立」(共立製薬(株))) を用いて、密栓下で 37°C、13 週間培養した。

液体培地で蛍光を検出した培地 170  $\mu$ l を、ヨーネスピン ver.2 (株)ファスマック) で DNA 抽出し、ヨーネジーン・KS を用いてリアルタイム PCR を実施した。また、寒天培地のコロニーを InstaGene DNA 精製マトリックス (BIO RAD) で DNA 抽出し、ヨーネジーン・KS を用いたリアルタイム PCR を実施した。

## 結果

### 1 病理解剖学的検査

外貌検査及び剖検では、患畜 a 及び b に、ヨーネ病の特徴所見は確認されなかった。

### 2 病理組織学的検査

患畜 a では、ヨーネ病の特徴所見である肉芽腫性の回腸炎・リンパ節炎が軽度に確認された (写真 1)。しかし、抗酸菌染色ではこれら肉芽腫性炎症が確認された部位に抗酸菌を確認できなかった。

患畜 b では、肉芽腫性リンパ節炎が軽度に確認された (写真 2)。しかし、抗酸菌染色では肉芽腫性炎症が確認された部位に抗酸菌を確認できなかった。

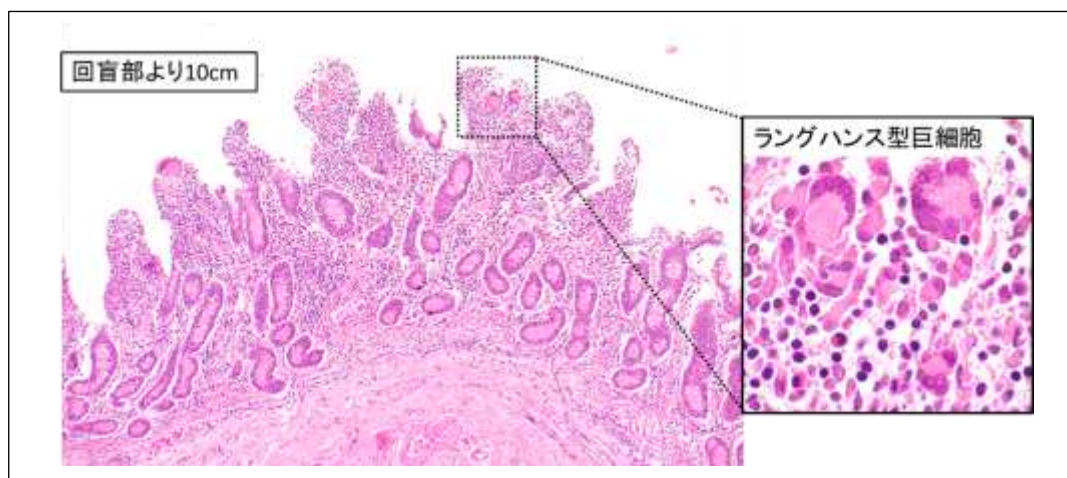


写真1 患畜 a : 回腸 (回盲部より 10 cm 上、H E 染色)

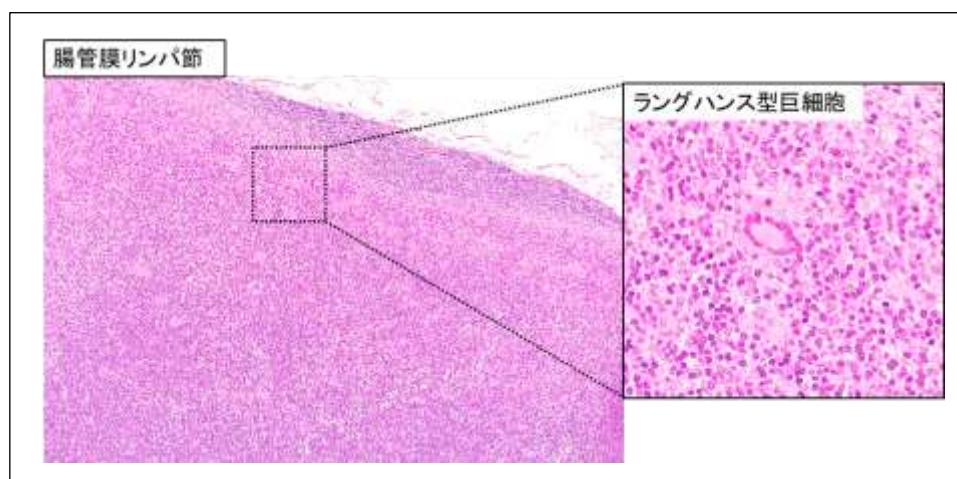


写真2 患畜 b : 腸間膜リンパ節 (H E 染色)

### 3 細菌学的検査

液体培地で蛍光があり、培養液のリアルタイムPCRでヨーネ菌特異遺伝子を検出したものを陽性、それ以外を陰性とした。また、寒天培地でコロニーを得られ、コロニーのリアルタイムPCRでヨーネ菌特異遺伝子を検出したものを陽性、それ以外を陰性とした (写真3)。

患畜 a では、消化管において、空腸を除く回腸 (1m上・50 cm上・30 cm上・10 cm上)、回盲部、盲腸及び結腸から、また、リンパ節において、空腸部腸間膜リンパ節を除く、回腸部腸間膜リンパ節、回盲リンパ節及び盲腸リンパ節からヨーネ菌を分離した (表 1)。使用した液体培地は、菌の増

殖により蛍光する培地であり、蛍光検出までの日数が短いほど、菌量が多い傾向がある。採材した材料別に比較すると、回腸から盲腸において菌量が多い傾向があった。

患者bでは、消化管において、結腸を除く空腸、回腸（1m上・50 cm上・30 cm上・10 cm上）、回盲部及び盲腸から、また、リンパ節において、乳房上リンパ節を除く、空腸部腸間膜リンパ節、回腸部腸間膜リンパ節、回盲リンパ節及び盲腸リンパ節からヨーネ菌を分離した（表 2）。採材した材料別に比較すると、回腸において菌量が多い傾向があった。

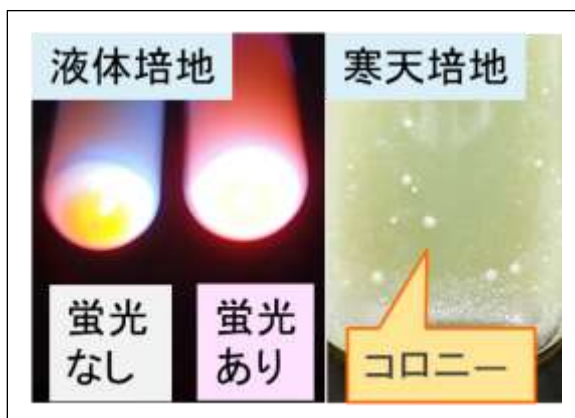


写真3 液体培地の蛍光と寒天培地上のコロニー

表1 患者aの分離培養検査結果

採材部位		液体培地		寒天培地	
		蛍光検出までの平均日数	判定	コロニー数	判定
空腸		発色無し	陰性	—	陰性
回腸	回盲部から1m上	12	陽性	+++	陽性
	回盲部から50cm上	12	陽性	+++	陽性
	回盲部から30cm上	18	陽性	+++	陽性
	回盲部から10cm位上	11	陽性	+++	陽性
回盲部		12	陽性	+++	陽性
盲腸		12	陽性	+++	陽性
結腸		21	陽性	++	陽性
空腸部腸管膜リンパ節		発色無し	陰性	—	陰性
回腸部腸管膜リンパ節		23	陽性	+++	陽性
回盲リンパ節		18	陽性	+++	陽性
盲腸リンパ節		18	陽性	+++	陽性

蛍光検出までの日数: 色分け

1～19日
20日以上

コロニー数の表記

+: 1～10個、
++: 11～100個、
+++: 101個以上

表 2 患畜 b の分離培養検査結果

採材部位		液体培地		寒天培地	
		蛍光検出までの平均日数	判定	コロニー数	判定
空腸		27	陽性	+	陽性
回腸	回盲部から1m上	17	陽性	+++	陽性
	回盲部から50cm上	12	陽性	+++	陽性
	回盲部から30cm上	17	陽性	+++	陽性
	回盲部から10cm位上	17	陽性	+++	陽性
回盲部		39	陽性	—	陰性
盲腸		26	陽性	+	陽性
結腸		発色無し	陰性	—	陰性
空腸部腸管膜リンパ節		27	陽性	+	陽性
回腸部腸管膜リンパ節		20	陽性	+++	陽性
回盲リンパ節		24	陽性	+++	陽性
盲腸リンパ節		20	陽性	+++	陽性
乳房上リンパ節		発色無し	陰性	—	陰性

蛍光検出までの日数：色分け

1～19日
20日以上

コロニー数の表記  
 + : 1～10個、  
 ++ : 11～100個、  
 +++ : 101個以上

## 防疫措置

### 1 発生農場 A

#### (1) 患畜確認時の防疫措置及び検査

患畜確認後に農場消毒を実施し、患畜確認時の検査として、同一施設で飼養する牛及び山羊（以下、同居牛及び山羊）の qPCR、山羊についてはヨーニン検査と補体結合反応（以下、CF）検査を実施した。同居牛の検査は全頭陰性であったが、山羊1頭がヨーニン検査において腫脹の差4mm以上の陽性、CF検査において抗体価が5倍希釈血清以下となり疑似患畜と決定された。

当該山羊は9歳の自家産で、患畜摘発時には患畜と同一畜舎で飼養されており、農場管理者の意向により、自主淘汰となった。

(2) まん延防止のための検査と清浄化

同居牛および山羊の q P C R を 1 年間で 3 回実施し、すべて陰性であった。

この検査を経て、発生農場 A は患畜確認から約 1 年で清浄化した ( 図 1 ) 。

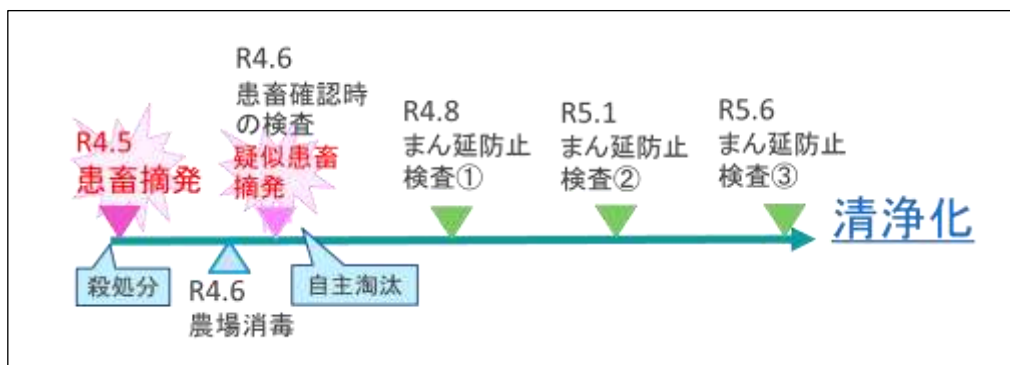


図 1 発生農場 A : 清浄化までの検査等

2 発生農場 B

(1) 患畜確認時の防疫措置及び検査

患畜確認後に農場の消毒を実施し、患畜確認時の検査として、同居牛の q P C R を実施し、1 頭で、  
ヨーネ菌 DNA 量が  $0.0002\text{pg}/2.5\mu\text{l}$  となり、定性陽性定量陰性牛と判定された。

当該牛は 5 歳の自家産で、県外移動歴はなく、患畜が摘発された令和 4 年 12 月のサーベイランス  
検査でも抗体陰性であった。当該牛は農場管理者の意向により、自主淘汰となった。

(2) まん延防止のための検査と清浄化

同居牛の q P C R を 1 年間で 3 回実施し、すべて陰性であった。

この検査を経て、発生農場 B は患畜確認から約 1 年で清浄化した ( 図 2 ) 。

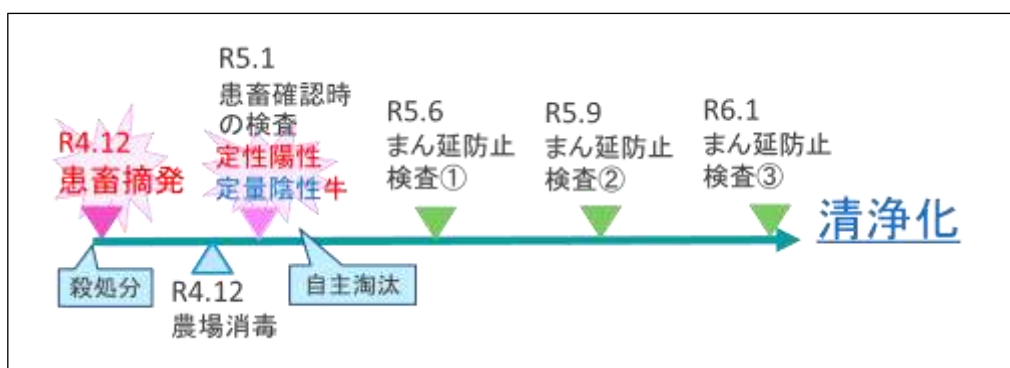


図 2 発生農場 B : 清浄化までの検査等

## 疫学調査

発生農場の疫学情報より、患畜 a は県外からの導入牛であり、患畜 b は県外預託歴があることから、2 頭はともに県外飼養歴がある。また、発生農場 A・B 間に疫学的な関連はない。

菌株の遺伝子解析として、MATR-VNTR 法を実施した結果、患畜 a 及び b の分離菌株は異なる型と判明した。

## まとめと考察

サーベイランス検査により、県内農場では 9 年ぶりに、2 農場で各 1 頭のヨーネ病患者が摘発され、2 事例とも肉眼的な特徴所見はなく組織の病変は軽度であったが、消化管及び付属リンパ節からヨーネ菌が分離された。

患畜確認後に、県運用方針に基づく全頭の遺伝子検査等を実施し、2 農場で各々、疑似患畜・定性陽性定量陰性牛が確認されたが、自主淘汰やその後の定期的な遺伝子検査により、早期清浄化を達成した。

2 農場間に疫学関連は無く、患畜 a 及び b の分離株は遺伝子解析で異なる型と判明した。過去に発生農場 A・B 間でヨーネ菌の水平伝播があった可能性は低いと考え、導入・預託等により、県外農場からのヨーネ菌侵入の可能性が示唆される。

ヨーネ病感染牛の多くは数年間、無症状で経過するが、抗体上昇前に糞便中にヨーネ菌を排出することが知られており、その期間は抗体検査では摘発できない<sup>4)</sup> (図 3)。

県運用方針では抗体陰性の糞便排菌牛を摘発するために、患畜摘発後は抗体検査ではなく、全頭の遺伝子検査を実施することとしており、今回の事例でも、抗体陰性の定性陽性定量陰性牛を摘発した。また、その後の検査では農場内の全頭が排菌していないことを確認し、2 農場ともに確実な清浄化を達成した。

今回の事例は、特に病変初期の患畜が発生した農場での qPCR 全頭検査が有効に機能した事例と言える。

今後も、本検査を活用して、ヨーネ病の確実なまん延防止対策を実施し、防疫対策の一助とする。



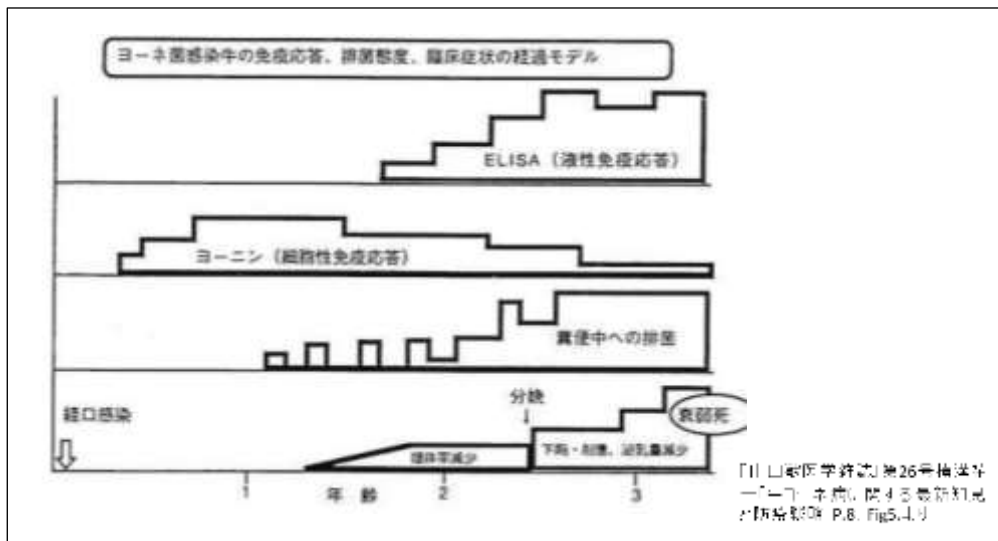


図3 ヨーネ菌感染牛の免疫応答、排菌、臨床症状の経過モデル

### 謝辞

最後に、多大なるご助言を賜りました、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 動物感染症研究領域 細菌グループ 川治聡子先生、及び多大なるご助言を賜り、また遺伝子解析を実施頂いた同グループ 上野勇一先生に深謝いたします。

### 引用文献

- 1) 病性鑑定指針（平成 27 年 3 月 13 日付 26 消安第 4686 号農水省消費・安全局長通知）、38-40
- 2) 牛のヨーネ病防疫対策要領（平成 25 年 4 月 1 日付 24 消安第 5999 号農水省消費・安全局長通知）
- 3) 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門：ヨーネ病検査マニュアル（2018 年 2 月 1 日版）（2018）
- 4) 横溝祐一：山口獣医学雑誌、第 26 号、1-26（1999）