

リアルタイムPCR導入後の牛ヨーネ病患畜摘発事例とその対応

県央家畜保健衛生所

津田 彩子 齋藤 恵
森村 裕之 宮下 泰人
和泉屋 公一 前田 卓也

はじめに

ヨーネ病は、家畜伝染病予防法（以下、法）において、家畜伝染病に指定されている。ヨーネ菌の感染により、慢性の水様性下痢、泌乳量の低下、消瘦等の症状を主徴とするが、明確な症状を示さない不顕性感染の状態も特徴であり、全国での摘発も依然として散発している¹⁾。

平成25年4月、法施行規則が改正され、リアルタイムPCR法（以下、qPCR）による診断が追加された。本県では平成22年以降、ヨーネ病の発生はなかったが、平成25年9月、当所管内の一農場でqPCRにより患畜3頭を摘発した。今回、この一連の対応から若干の知見を得たので、その概要を報告する。

法施行規則改正とqPCRの位置づけの変遷

今回改正された術式であるエライザ法とqPCRの、規則改正前後における判定について表1、2にまとめた。規則改正前（以下、改正前）のエライザ法では1回目の検査で疑似患畜、14日後の2回目の検査でも陽性の場合に患畜と判定したが、規則改正後（以下、改正後）はエライザ法単独で判定

表1 法施行規則改正による別表第一の変更点

術式	改正前	改正後
エライザ法	1回目陽性→疑似患畜 2回目陽性→患畜	ヨーニン検査併用 エライザ法陽性かつヨーニン腫脹差2mm以上 もしくは エライザ法陰性かつヨーニン腫脹差2mm以内→疑似患畜 エライザ法陽性かつヨーニン腫脹差2mm以上→患畜
qPCR	なし	陽性(糞便抽出液2.5μl中に0.001pg以上の遺伝子量) →患畜

することはできなくなり、ヨーニン検査と併用し、エライザ法陽性かつヨーニンの反応による腫脹差

が2mm以上で患畜と判定する。一方、qPCRは、1回の検査で規定の遺伝子量以上である定量判定陽性の場合、即日患畜となる。

表2 牛のヨーネ病防疫対策要領に基づくqPCR判定基準

定性判定陽性	患畜決定の遺伝子量には満たない
定量判定陽性	糞便抽出液2.5μl中に0.001pg以上の遺伝子量

※定量判定陽性の場合に患畜となる。

ヨーネ病検査におけるqPCRは、平成18年11月に制定された牛のヨーネ病防疫対策要領及び補助資料のヨーネ病検査要領に補助的診断法として導入され、平成20年

9月の同検査要領改正によりまん延防止のための検査に位置づけられ、エライザ法と併用で診断できるようになった。さらに、今回の法施行規則の改正で、初めて別表第一に追加され、法第5条第1項に基づくヨーネ病検査（以下、5条検査）等の患畜摘発に用いられることとなった。

発生農場の概要

当該農場は労働力4名の家族経営で、搾乳牛32頭、子牛5頭、山羊1頭を飼養する酪農家で、育成牛の多くを県内外に預託していた。飼料はスーダン、チモシー、アルファルファ及び配合飼料を給与、1頭あたりの平均乳量は30kg/日であった。過去にヨーネ病の発生はなかった。

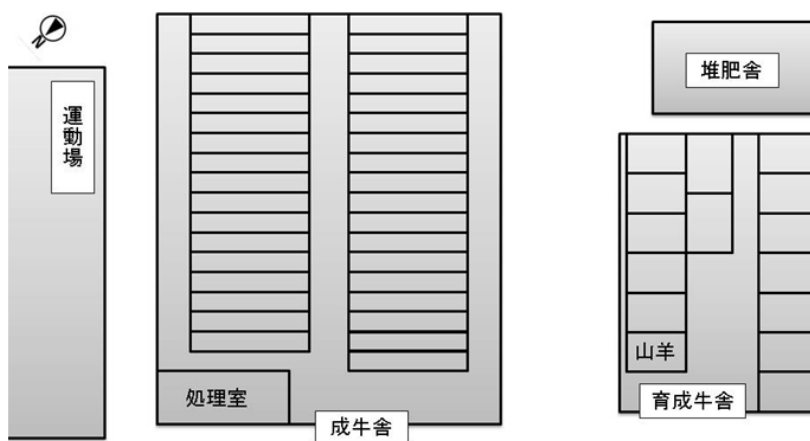


図1 発生農場見取り図

山羊は、平成26年9月初旬に導入され、育成牛舎の牛房の1つで飼養されていた（図1）。

発生の概要と防疫対応

1 初発患畜摘発の経緯と防疫対応

平成25年9月24日、5条検査を実施し、予備的抗体検出法（以下、スクリーニング法）で、成牛32頭中1頭が陽性となり、当該牛を26日にqPCRに供した。その結果、qPCR定量判定陽性で、患

畜（以下、患畜1）として摘発し、翌27日に法第17条第1項の1の規定に基づき、殺処分した。患畜1は下痢や消瘦等の臨床症状は認めなかったが、病性鑑定を実施したところ、剖検で空回腸及び回盲



写真1 患畜1の外貌（左）と腸管所見（右）

部粘膜の著しい肥厚、皺壁形成を認めた（写真1）。病理組織学的検査では、ヨーネ病検査要領に規定される検査部位（回腸回盲部より10cm上、30cm上、50cm上、1m上、回盲リンパ節、回腸部腸管膜リンパ節、空腸部腸間膜リンパ節及び乳房上リンパ節）のZiehl-Neelsen染色により、類上皮細胞及びラングハンス巨細胞内に抗酸菌を多数確認した（写真2）。患畜1は、検査部位全てで抗酸菌が認められた。

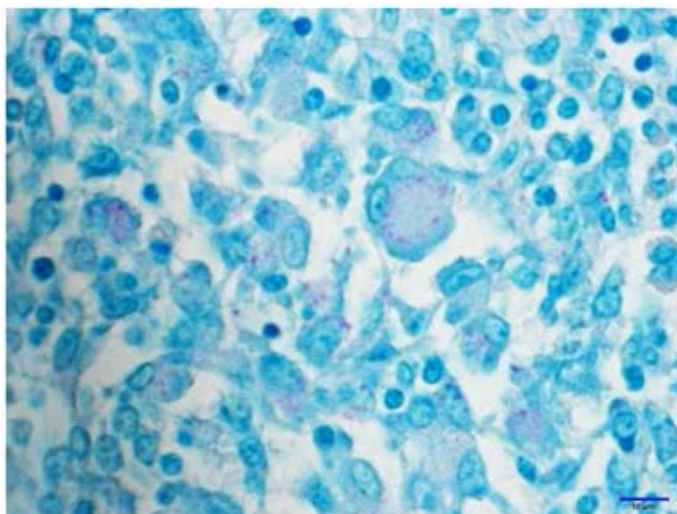


写真2 患畜1の腸管組織所見
（小腸回盲部より10cm上×1,000
Ziehl-Neelsen染色）

また、患畜1が9月6日に分娩した産子は翌月県外に預託する予定であったが、農場カテゴリーがⅡとなったため、原則移動できないこと、及び患畜の産子は保菌しているリスクが高いことを説明したところ、9月28日、畜主が自主淘汰した。

10月2日、第25条に基づき農場消毒を指示した。塩素系消毒薬、消石灰等を用いて成牛舎を中心に実施し、特に患畜が居た牛房は徹底的に洗浄、消毒を行った。

2 患畜摘発時の検査（以下、同居牛検査）と防疫対応

10月7日からqPCRによる同居牛検査を実施した。3日間に渡り、同居山羊を含む38頭を検査した結果、定量判定陽性による患畜2頭（以下、患畜2及び患畜3）を摘発したほか、定性判定陽性を示した牛4頭を確認した。この4頭と、患畜3が直近に分娩した子牛1頭について、再度保菌しているリスクを畜主に説明・指導し、10月11日、畜主が自主淘汰した。患畜2及び3にも患畜1と同様、臨床症状は認めなかった。病性鑑定の結果、患畜1より軽度であったが、患畜2及び3ともに小腸粘

膜の充血・肥厚を認めた（写真3）。病理組織学的検査の結果、患畜2、3ともに回腸絨毛に一部肥厚が認められ、粘膜固有層に好酸球を主体とした炎症像を認めたが、粘膜固有層、粘膜下織及びリンパ節における類上皮細胞のび慢性増殖やラングハンス巨細胞の出現等の典型的なヨーネ病の病理所見²⁾は認めなかった。また、検査部位全てでZiehl-Neelsen染色による菌体の確認はできなかった。

山羊は、牛と同様にqPCRを実施するとともに、ヨーニン検査及び補体結合反応検査を実施し、全て陰性であった。

同居牛検査では、成牛だけでなく、子牛に3頭の定性判定陽性牛を認めたため、2回目の農場消毒作業では成牛舎の再洗浄とともに、育成牛舎の洗浄、消毒を徹底して行った。



患畜2



患畜3



写真3 患畜2および3の外貌（左）と

腸管所見（右）

3 今回の防疫措置の概要

今回の事例では、初発患畜及び同居牛検査で摘発した患畜3頭の殺処分に加え、定性判定陽性牛4頭、患畜分娩子牛2頭の計6頭を自主淘汰した。スクリーニング法陽性から患畜摘発まで2日、同居牛検査終了まで16日、2回の農場消毒を含む防疫措置完了まで24日であった。

ま と め

図2は、ヨーネ病発生から清浄化までの改正前と改正後の検査の流れを時間軸で表した。改正前は、スクリーニング法で陽性になった後、1回目のエライザ法陽性から2回目陽性で患畜になるまでの2週間の疑似患畜期間があった。改正後、qPCR導入により即日患畜決定となり、大幅に期間が短縮された。また、まん延防止のための検査も、現在はqPCR単独での検査による判定で即日患畜が決定することとなり、検査体制が厳格化された。

改正前の検査体制におけるヨーネ病疑似患畜期間中の農家負担について表3にまとめた。患畜となった場合、14日分の排菌による農場内汚染リスクの拡大、疑似患畜期間中の搾乳・廃棄の労力増大、

飼料代の負担が生じており、陰性を確認した場合も期間中の生乳廃棄による損害等が負担となっていた。また、患畜の疑いがある牛を飼いつける不安感や、生産物を捨て続けることによる農家の精神的負担もあったが、qPCR導入による患畜決定までの期間短縮により、これら全ての負担軽減につながった。

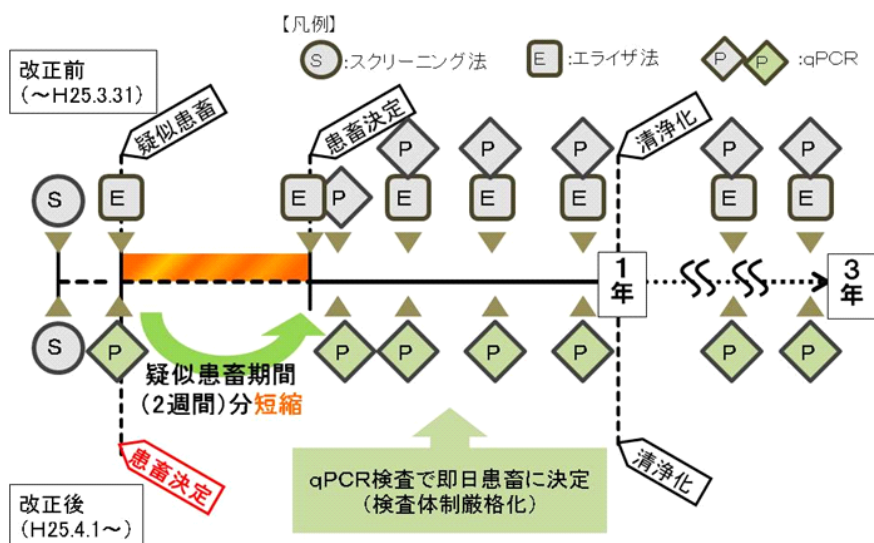


図2 ヨーネ病発生から清浄化までの検査の流れ

さらに、従来はエライザ法で対応できなかった6ヶ月齢未満の子牛も、qPCRでの早期診断が可能となった。これにより、肥育素牛等を介してヨーネ菌が農場間で伝播するリスクを軽減できるとともに、保菌牛の早期摘発・淘汰により、より一層の清浄化促進が図られると考えた。一方、肥育素牛にも牛ヨーネ病防疫対策要領に規定される健康牛移動時の検査証明書の添付が可能となる。しかし、発生農場でのまん延防止のための検査証明書が、証明書の意義の周知不足により、かえって発生農場の証明となってしまう、子牛の流通を妨げてしまう可能性が懸念された。

表3 改正前の検査体制における疑似患畜期間中の農家負担

	ヨーネ病のまん延	生乳廃棄による損害	農家の精神的負担
疑似患畜→患畜	✓糞便14日分の排菌リスク	✓14日間の搾乳・廃棄の労力増大 ✓14日分の飼料代負担	✓患畜の疑いを持つ牛を飼いつける不安 ✓生産物(生乳)を捨て続ける精神的負担
疑似患畜→陰性		✓14日分の生乳廃棄による損害	

現在の本県では機器の同時処理検体数、検査に従事する職員の人員不足等から、qPCRの処理検体数が一定数を超えると検査時間が大幅に増える。また、本県では患畜が決定した場合、当該牛の生乳の出荷は採材日の朝に遡り、停止している。今回の規則改正により、同居牛検査でも生乳廃棄を最小限に抑えるためには、検査結果は採材日夕方の搾乳前に出す必要があるが、時間までに結果を出すためには1日あたりの処理検体数に制約があり、飼養頭数の多い農場の同居牛検査では日数がかかることが予想された。

以上のことから、現場での運用上若干の課題はあるものの、qPCRによる検査は本病撲滅の一層の推進が期待されると考える。

引用文献

- 1) 農林水産省消費・安全局：家畜衛生週報、No. 3217、p6-7（2012） No. 3247、p6-7（2013）
- 2) 清水悠紀臣ら：動物の感染症（第2版）、p129-130、近代出版（2004）