

【短報】

肉用牛繁殖農場におけるヨーネ病スクリーニング遺伝子検査の活用

中尾聡子¹⁾，奥村尚子¹⁾，渡嘉敷美波¹⁾，新田芳樹¹⁾，宮良あゆみ¹⁾

1)家畜衛生試験場 2)北部家畜保健衛生所

【はじめに】ヨーネ病はヨーネ菌の感染によって引き起こされる、牛、山羊、羊等の反芻動物の肉芽腫性腸炎で、病気の経過が極めて長く、感染から発症までに1～数年の潜伏期間がある。発症牛は持続性の下痢、泌乳量の低下、空胎期間延長、栄養状態の悪化による消瘦等を起こし、やがて死に至る。また感染牛は発症するまでの無症状時期においても糞便中にヨーネ菌を排菌することがある。ヨーネ病発生農場における清浄化対策は定期的な牛群検査による感染牛の摘発淘汰を中心に行われており、ELISA 法による抗体検査が用いられる。しかし抗体陰性排菌牛が摘発されずに農場汚染を拡大することが懸念されることから、スクリーニング遺伝子検査法が開発され、販売されている[1,2]。沖縄県では2012 年 12 月にリアルタイム PCR 法がヨーネ病診断薬に承認されて以降、2013 年と2014 年に乳用牛で 2 頭の患畜が摘発されている。しかし2019 年以降は肉用牛で 9 頭の患畜が摘発されており、肉用牛繁殖農場におけるヨーネ病対策が課題となっている(図 1)。そこでヨーネ病発生農場の早期清浄化を目的として、現行の抗体検査に加えてスクリーニング遺伝子検査を活用した 2 事例について報告する。

頭が患畜と診断された。事例 2: 飼養頭数 115 頭の肉用牛繁殖農場で、2021 年に食肉衛生検査所よりヨーネ病の届出があり、出荷元農場の疫学関連農場として立入検査を実施したところ、繁殖雌牛 7 頭が患畜と診断された。事例 1,2 で摘発された患畜の月齢は 0～135 ヶ月齢まで様々であり、外貌所見や剖検所見ではヨーネ病を疑うような特徴的所見は見られなかったが、抗体検査、遺伝子検査、病理組織学的検査からヨーネ病と診断された(図 2)。

患畜のヨーネ病検査成績 (事例1,2)									
事例 No.	月齢	外貌所見		剖検所見		抗体検査		遺伝子検査	
		削痕	下痢	腸粘膜	腸間膜リンパ節	ELISA	公定法	スクリーニング	病理組織学的検査
事例1-1	26	なし	なし	軽度肥厚	腫大	1.06	45.99	陽性	肉芽腫性リンパ節炎
事例1-2	0	なし	なし	異常なし	異常なし	0.98	0.0089	陽性	肉芽腫性リンパ節炎
事例2-1	66	なし	なし	異常なし	異常なし	0.96	5.9205	陽性	肉芽腫性リンパ節炎
事例2-2	105	なし	なし	異常なし	異常なし	1.04	1.3085	陽性	肉芽腫性リンパ節炎
事例2-3	98	なし	なし	軽度肥厚	異常なし	0.41	0.0012	陽性	肉芽腫性リンパ節炎
事例2-4	108	軽度	なし	異常なし	軽度肥厚	0.45	0.0073	陽性	肉芽腫性リンパ節炎
事例2-5	135	なし	なし	軽度肥厚	異常なし	0.49	0.0015	陽性	肉芽腫性リンパ節炎
事例2-6	80	なし	なし	異常なし	異常なし	0.89	0.0036	陽性	肉芽腫性リンパ節炎
事例2-7	33	なし	なし	異常なし	異常なし	0.60	0.0093	陽性	肉芽腫性リンパ節炎

図 2 ヨーネ病患畜の検査成績まとめ

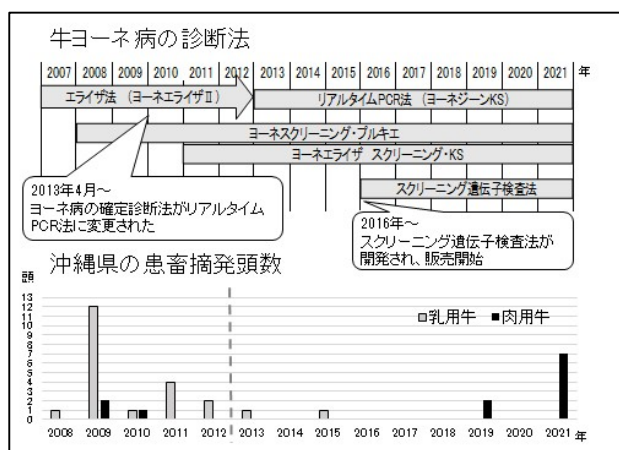


図 1 牛ヨーネ病診断法と患畜摘発頭数

【発生概要】事例 1: 飼養頭数 186 頭の肉用牛繁殖農場で、県外家畜市場から導入した繁殖雌牛がヨーネ病患畜の産子であると情報提供を受けたため、2019 年に立入検査を実施したところ、当該牛とその産子 2

【材料と方法】事例 1: 農場全頭検査は農場飼育牛 190 頭を牛房ごとに 2～10 頭プールした 28 検体についてスクリーニング遺伝子検査を実施した。陽性となった検体については個別に遺伝子を抽出して再検査を実施した。環境拭き取り検査は牛床、ウォーターカップ、餌槽、通路について 99 検体採材し、牛房ごとに 2～8 ヶ所プールした 28 検体についてスクリーニング遺伝子検査を実施した。その後、定期的な抗体検査に加えて分娩した母牛のスクリーニング遺伝子検査を 8 回 66 頭実施した。事例 2: 農場全頭検査は患畜 7 頭を含む 115 頭について個別に遺伝子を抽出してスクリーニング遺伝子検査を実施した。陽性検体については検体の増幅曲線から得られた Ct 値と弱陽性コントロールの Ct 値を比較して遺伝子量を推察した。同居牛の追跡検査として 6 ヶ月齢以上の抗体陰性牛について、7 月は 85 頭、11 月は 87 頭のスクリーニング遺伝子検査を実施した。環境拭き取り検査は牛床、壁やス

タンション、飼槽、ウォーターカップ、通路、トラックやトラクタータイヤについて、3 月は 36 検体、6 月は 36 検体、翌年 2 月は 40 検体採材し、全て個別に遺伝子を抽出してスクリーニング遺伝子検査を実施した。

【結果】事例 1:190 頭をプールした材料 28 検体を用いたスクリーニング遺伝子検査の結果、9 検体が陽性、19 検体が陰性だった。プール材料で陽性となった検体について個別で検査した結果、21 頭が陽性(陽性率 11.1%)だった。プール材料で陽性となった 9 検体中 4 検体は個別で検査した結果全て陰性だった。環境拭き取り検査ではプールした 28 検体中 21 検体が陽性であり、全ての牛舎で陽性が確認された。分娩した母牛のスクリーニング遺伝子検査は 66 頭全て陰性だった。事例 2:立入検査時は 115 頭中 61 頭が陽性(陽性率 53.0%)であり、患畜 7 頭は全て陽性だった。陽性牛 61 頭のうち弱陽性コントロールより Ct 値が低い牛は 8 頭であり、そのうち 5 頭が患畜だった。6 ヶ月齢以上の抗体陰性牛のスクリーニング遺伝子検査の結果、7 月は 85 頭中 8 頭が陽性(陽性率 9.4%)、11 月は 87 頭中 9 頭が陽性(陽性率 10.3%)だった。陽性母牛の追跡検査の結果、7 月は陽性牛 25 頭中 20 頭が陰性となり、11 月は陽性牛 25 頭中 22 頭が陰性となったが、中には陽転する牛や複数回にわたり陽性となる牛が見られた。環境拭き取り検査は 3 月に 36 検体中 17 検体が陽性だった。それぞれの陽性率は牛床 75%(6/8 ヶ所)、壁やスタンション 63%(5/8 ヶ所)、飼槽 25%(2/8 ヶ所)、ウォーターカップ 0%(0/7 ヶ所)、通路 100%(3/3 ヶ所)、タイヤ 50%(1/2 ヶ所)だった。3 ヶ月後に再検査を実施した結果、全て陰性だった。しかし翌年 2 月に実施した結果、40 検体中 2 検体が陽性であり、その内訳は陽性牛隔離牛舎の牛床と草地トラクターのタイヤだった。

【まとめと考察】事例 1 では患畜摘発後のスクリーニング遺伝子検査で畜舎環境から広くヨーネ菌が検出されたため、徹底した畜舎消毒を実施した。その後の検査で患畜は摘発されず、スクリーニング遺伝子検査も全て陰性だった。事例 2 では患畜摘発時のスクリーニング遺伝子検査で半数以上の牛がヨーネ菌遺伝子陽性だったが、畜舎消毒を徹底した後の再検査では陽性牛の多くが陰転した。この結果から患畜摘発時は畜舎環境が広くヨーネ菌に汚染されているため、スクリーニング遺伝子検査では通過菌を検出した可能性があると考えられた。しかし陰性牛群の中には陽転する母牛

が見られたため、ヨーネ病発生農場では長期的なまん延防止対策が必要であると考えられた。スクリーニング遺伝子検査は検体をプールして検出可能だが、プール材料は個々のヨーネ菌を集約して検出するため、個別で検査すると全て陰性になることがあった(図 3)。環境材料などは検体をプールすることでヨーネ菌遺伝子を高感度に検出可能となるが、同居牛検査では陽性牛を特定する必要があるため、事例 2 のような高度汚染農場では検体をプールせず個別に検査の方が効率的であると考えられた。スクリーニング遺伝子検査の判定方法は融解曲線解析で見られる解離温度で判定するが、多くの陽性検体が IC ピークと陽性ピークの両方を認め 2 峰性の曲線となるため、陽性検体が多い場合は検査結果を画像で示すのが困難だった。そこで解離曲線解析で陽性と判定した検体について、蛍光増幅曲線の立ち上がり画像を表示することで陽性検体のイメージが伝わりやすくなった(図 4)。スクリーニング遺伝子検査は PCR 阻害物質等の影響による偽陰性を避けるためにインターナルコントロールを含んでおり、ヨーネ菌遺伝子の定量はできない。しかし事例 2 で摘発された患畜 7 頭のヨーネ菌遺伝子量とスクリーニング遺伝子検査の Ct 値に相関性が見られたため、陽性検体の Ct 値からヨーネ菌遺伝子量を推定することができた。判定方法は弱陽性コントロールの Ct 値を基準として、Ct 値が低い検体を陽性(++)、Ct 値が高い検体を陽性(+)と表示した。事例 2 では陽性 61 頭中 8 頭が陽性(++)であり、患畜 7 頭中 5 頭が陽性(++)だったことから、陽性(++)の牛は特に排菌量が多いと推察された(図 5)。ヨーネ病は発生から清浄化するまでに長期的な対策が必要であり、定期的な抗体検査では摘発されない抗体陰性排菌牛が農場清浄化を遅らせることが問題となっている。そこで患畜摘発後に同居牛や環境拭き取り材料のスクリーニング遺伝子検査を行い農場の汚染状況を把握し、無症状の排菌牛を早期摘発することで本手法は農場清浄化対策に活用できると考えられた(図 6)。

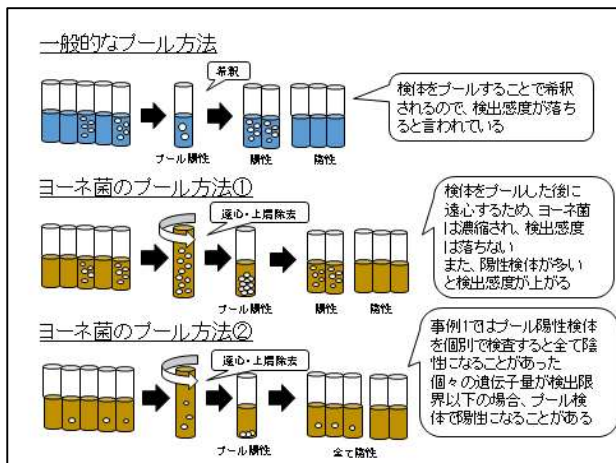


図3 プール検体の検査方法

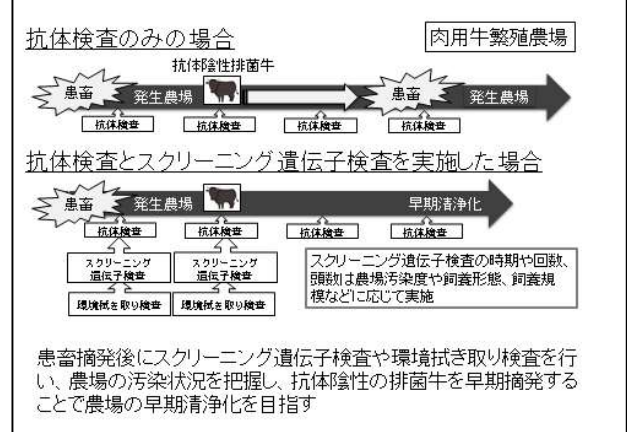


図6 発生農場におけるスクリーニング遺伝子検査の活用方法

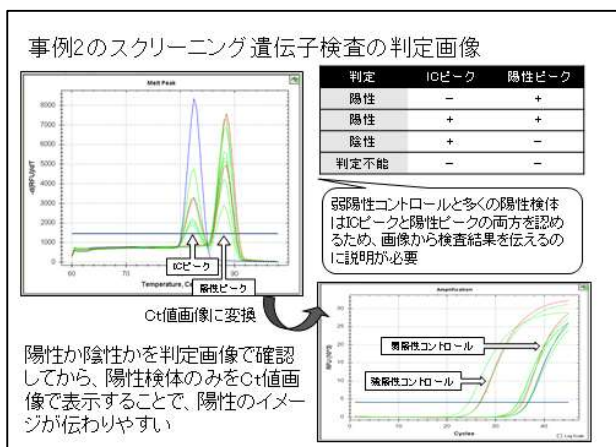


図4 スクリーニング遺伝子検査の解析方法①

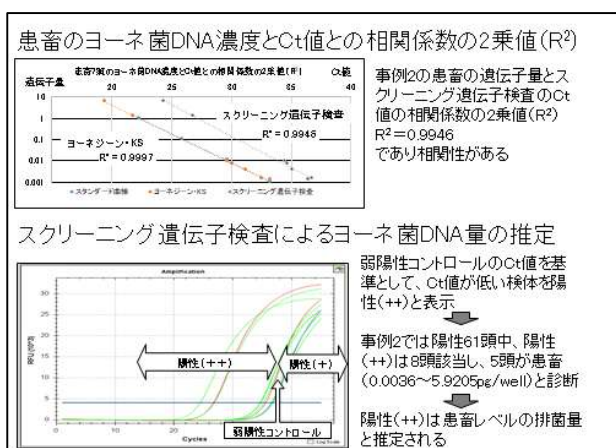


図5 スクリーニング遺伝子検査の解析方法②

【引用文献】

- [1] 永田礼子,令和2年度臨床獣医師防疫対策強化事業 特定疾病等に関する防疫技術研修,牛のヨーネ病の病性と診断,2020
- [2] SATOKO Kawaji et al, A Novel Real-Time PCR-Based Screening Test with Pooled Fecal Samples for Bovine Johne's Disease, Journal of Clinical Microbiology, 58(12), 2020