

【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

中尾聰子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削瘦等を起こし、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。

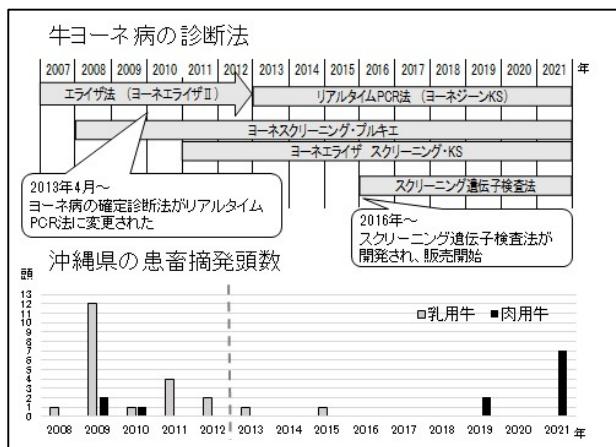


図 1 牛ヨーネ病診断法と患畜摘発頭数

【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

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)。

事例 No.	月齢	外貌所見			剖検所見		抗体検査		遺伝子検査		病理組織学的検査		
		削瘦	下痢	腸粘膜 脣間膜 リンパ節	ELISA	公定法	スクリーニング				肉芽腫性腸炎	肉芽腫性リンパ節炎	抗酸菌染色
								肉芽腫性腸炎	肉芽腫性リンパ節炎	抗酸菌染色			
事例1-1	26	なし	なし	軽度肥厚	肥厚	1.06	45.99	+	+	+	+	+	+
事例1-2	0	なし	なし	異常なし	異常なし	0.98	0.0089	一	一	一	一	一	+
事例2-1	66	なし	なし	異常なし	異常なし	0.96	5.9205	陽性	+	+	+	+	+
事例2-2	105	なし	なし	異常なし	異常なし	1.04	1.3085	陽性	+	+	+	+	+
事例2-3	98	なし	なし	軽度肥厚	異常なし	0.41	0.0012	陽性	+	+	+	+	+
事例2-4	108	軽度	なし	異常なし	軽度肥厚	0.45	0.0073	陽性	一	+	+	+	+
事例2-5	135	なし	なし	軽度肥厚	異常なし	0.49	0.0015	陽性	+	一	+	+	+
事例2-6	80	なし	なし	異常なし	異常なし	0.89	0.0036	陽性	+	+	+	+	+
事例2-7	33	なし	なし	異常なし	異常なし	0.60	0.0093	陽性	+	+	+	+	+

図 2 ヨーネ病患畜の検査成績まとめ

【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 ケ所プールした 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增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%)、1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する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)。

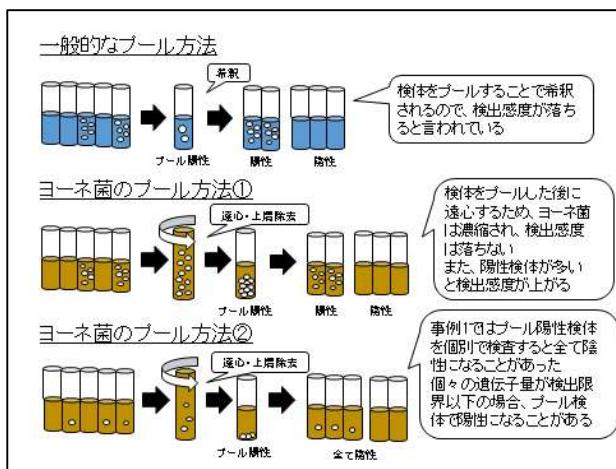


図3 プール検体の検査方法

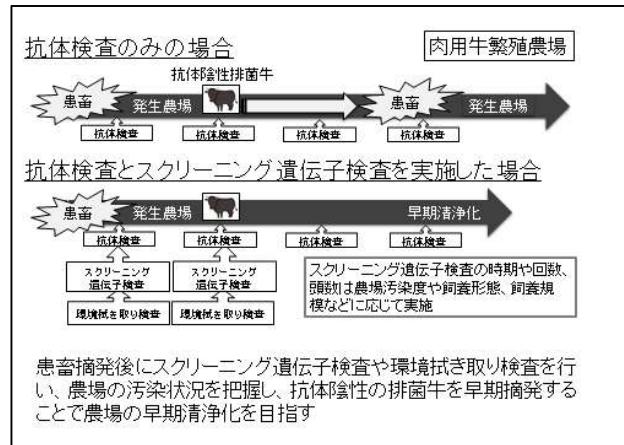


図6 発生農場におけるスクリーニング遺伝子検査の活用方法

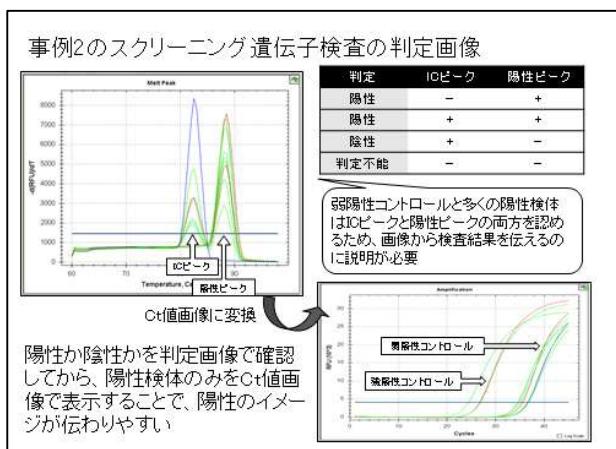


図4 スクリーニング遺伝子検査の解析方法①

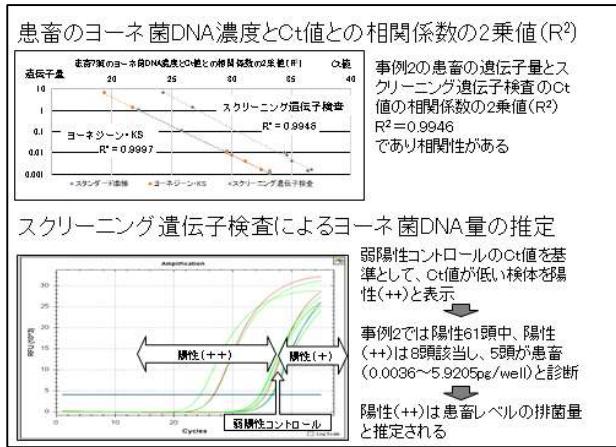


図5 スクリーニング遺伝子検査の解析方法②

【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