

2 リアルタイム PCR 検査を活用したヨーネ病清浄化対策

県北家畜保健衛生所

黒川由貴江、湯澤裕史、岡崎克美、半田真明

はじめに

ヨーネ病は、これまでヨーネ病防疫対策要領に基づき清浄化対策が講じられてきた。本県では、平成 20 年 12 月に県の防疫対策要領を改正し、リアルタイム PCR 検査(rPCR 検査)を対策に取り入れることとした。平成 24 年度まで血清学的検査(エライザ法)が本病の診断法とされていたが、平成 22 年以降、エライザ法は陽性となりながら、遺伝子検査や細菌検査において陰性となる事例が全国的に注目されるようになり、「ヨーネ病検査に関する技術検討会」が開催されるに至った。また、平成 24 年 2 月からエライザ法で陽性を示した検体について rPCR 検査で確定診断するなどの暫定措置を行うこととなった。

平成 24 年度当初、当所管内には、発生農場が 14 農場存在し、1,000 頭以上飼養するメガファームを含む大規模農場 8 農場も含まれていた(表 1)。そのため、早期清浄化のためには、より効率的な対策を講じることが重要な課題であった。平成 23 年までの検査成績をとりまとめた結果、未だ多くの rPCR 検査陽性牛が飼養され続けていることが判明した。rPCR 検査で排菌牛を摘発し自主とう汰を指導しても、農場内の環境汚染度が不明なため、1 回の検査では通過菌の可能性を否定できず、畜主の理解を得られなかったことがその原因と推測された。

平成 25 年 4 月の家畜伝染病予防法施行規則の改正により、rPCR 検査が確定診断法になると、生乳出荷制限の観点から、搾乳牛の

rPCR 検査による全頭一斉検査の実施は困難となることが予想されたため、まず平成 24 年度に rPCR 検査による全頭検査を実施し、各農場の浸潤状況を把握した。その成績に基づき、rPCR 検査を活用し、各農場の飼育環境及び浸潤状況等に応じた効率的な清浄化対策に取り組んだので、その概要を報告する。

表 1 当所管内のカテゴリー II 農場

(H24 年度当初)

農場	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	
飼養頭数	1128	1030	774	481	86	762	435	353	243	128	23	59	40	38	
飼養形態	フリーバーン(FB)					フリーストール(FS)					つなぎ				

1. 対策の概要と経過

本対策の経過を図 1 に示した。

(1)全頭検査：平成 24 年度にヨーネ病カテゴリー II 農場で飼養されている全頭の rPCR 検査を実施し(20 戸 6,074 頭)、陽性牛(排菌牛)を摘発することに努めた。

(2)追跡牛検査：平成 20 年度から 23 年度までに摘発した排菌牛及び平成 24 年度の全頭検査で摘発した排菌牛を「追跡牛」とし、平成 24 年度からとう汰指導と同時に頻回検査を実施した。

(3)導入牛検査：若齢牛の清浄性確認のため、自家育成牛や導入牛(特に大規模農場で定期的に導入される初妊牛)の rPCR 検査を実施した。

(4)環境検査：カテゴリー II 全農場に対し、

環境材料の rPCR 検査を実施し、検出状況を調査した。環境検査は、農場を把握する上で効率的かつ安価な方法であり¹⁾、フリーストールやフリーバーン牛舎において、牛が共通して使用する通路や堆肥貯蔵エリアを採材することにより、効率的に農場内の汚染状況を把握することができること²⁾、また、国内の畜舎環境検査の活用事例³⁾⁻⁵⁾を参考として、表2に示すとおり採材を行った。さらに、追跡牛検査で結果に大きな変動を示した牛がいた2農場（I農場、C農場）（表1）では複数回検査を実施した。なお、畜舎消毒の効果検証のための予備検査として、消石灰を陽性糞便に混合し、ヨーネ病検査マニュアル⁶⁾に準じて抽出後 rPCR 検査を実施した。

表2 牛舎形態と採材場所

牛舎形態	採材場所
フリーバーン フリーストール	搾乳待機場、パーラー戻り通路、パーラー、堆肥、牛床、飼槽など
つなぎ牛舎	堆肥、バーンクリーナー、飼槽など

(5) 畜舎消毒：環境検査において汚染度が高いと判明した3農場において、石灰乳による徹底した畜舎消毒を実施した。

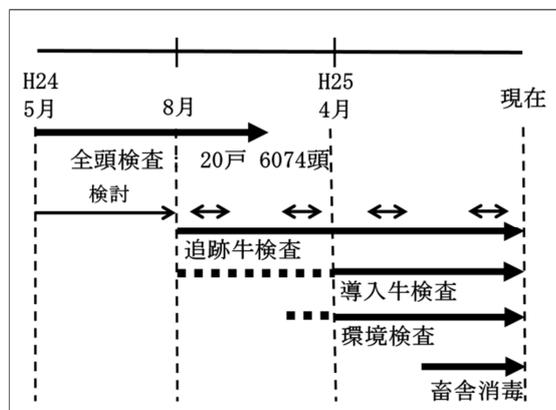


図1 対策の経過

2. 糞便の検査方法

(1) 全頭検査：平成24年度4月から12月までに6,074頭採糞しヨーネ病検査マニュアル⁶⁾に準じた rPCR 検査を実施した。

(2) 追跡牛検査：検査対象は平成20年度から平成23年度までに摘発した排菌牛39頭に24年度以降摘発した56頭を加え、合計95頭から開始した。平成25年4月以前の施行規則改正前には、rPCR検査とエライザ検査の組み合わせにより患畜の確定を行い、改正後は rPCR 検査のみで確定した。

(3) 導入牛検査：平成24年8月から平成25年3月までに1戸192頭、平成25年4月から12月までに13戸1,115頭について rPCR 検査を実施した。定性陽性を示した牛については、自主とう汰指導と同時に追跡牛に組み入れた。

(4) 環境検査：カテゴリーII全農場(14農場)で採材を行い、ヨーネ病検査マニュアル⁶⁾に準じた rPCR 検査を実施した。

(a) 環境材料の採材方法

搾乳待機場、パーラー、パーラー戻り通路では、動力噴霧器による徹底洗浄後、全頭の搾乳終了後に残った新鮮便を採材した。R. D. Berghausらの方法¹⁾を参考に待機場やパーラーでは4㎡ごと(2m四方)に1g、戻り通路では2m間隔で1g採取した。飼槽では、湿らせたガーゼ(10cm×10cm)に紐をつけてサルモネラ検査の索引スワブ法⁷⁾と同様にひきずり(ひきずり法)を実施した。牛床では、2m間隔で新鮮便を5か所プールし1g採取した。堆肥は、未熟・完熟堆肥ごとに1m間隔で5か所プールし1g採取した。

(5) 畜舎消毒

基本的な手順に沿って、くもの巣除去などの掃除や電気系統の目張りに続き、天井を含めて徹底的に水洗し、石灰乳を塗布した(写

真 1)。なお、環境からのヨーネ菌遺伝子摂取（通過菌）の影響を確認するため、フリーストール牛舎である K 農場（表 1）において、消毒後、飼養頭数全頭について、5 日間連続、その後 1 週間ごとに 3 回、さらに 1 か月間隔で 2 回の約 3 か月間にわたり採糞し、rPCR 検査を実施した。

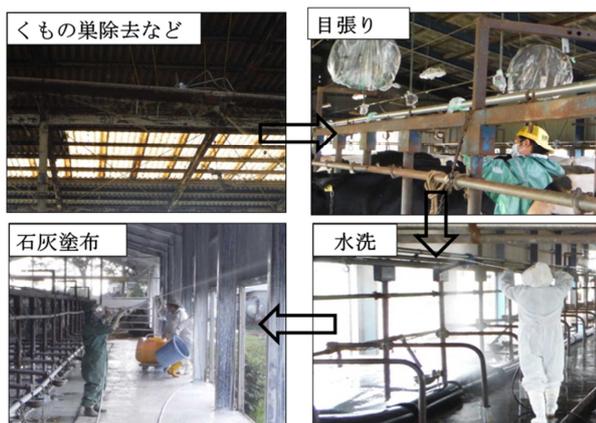


写真 1 畜舎消毒

3. 検査成績

(1) 追跡牛検査：摘発された排菌牛（追跡牛）のうち、平成 24 年度に 8 頭、25 年度は 1 月までに 6 頭が患畜として摘発され、殺処分となった。平成 26 年 1 月現在、死亡した 18 頭を除く 47 頭が生存しているが、平成 24 年度に 9 頭、平成 25 年 4 月から 12 月までに 21 頭、合計 30 頭が自主とう汰された。

個体ごとの成績は、その検出パターンにより、A：未検出から基準値以上に上昇し、回数を重ねるごとに上昇したパターン、B：徐々に上昇したパターン、C：1 回目高値を示した後、未検出になり、その後上昇したパターン、D：検出、未検出を示し大きな変動を示したパターン、E：一度検出され、その後検出されないパターンの 5 つのパターンに分類された。また、上記 A～D のうち、特徴的なものを図 2-1～4 に示した。A～D では、糞便の rPCR 検

査を 5 回実施しており、4 回目までは、平成 24 年度までの成績であり、ヨーネ菌遺伝子が規準値以上検出されても患畜にならず自主とう汰もされなかったが、平成 25 年度に定量陽性 (1×10^{-3} pg/2.5 μ l 以上) で患畜となった。

(2) 導入牛検査：平成 25 年 4 月の施行規則改正前は 1 戸 192 頭中 3 頭、改正後 12 月までに 13 戸 1,115 頭中 9 頭、計 12 頭が定性陽性を示した。（表 3）

表 3 導入牛検査成績

実施時期	検査戸数	検査頭数	陽性頭数
施行規則改正前	1	192	3
施行規則改正後	13	1,115	9
合計	13(実戸数)	1,307	12

(3) 環境検査：

カテゴリー II 全農場（14 農場）のうち、陽性を示した農場の採材場所別の陽性率を表 4 に示した。過去に発症牛が存在した K、N 農場では、採材したほぼ全ての場所から $10^{-6} \sim 10^{-2}$ オーダーのヨーネ菌遺伝子が検出され、陽性率はそれぞれ 63.5%、96.4%であった。

複数回検査を実施した 2 農場のうち、I 農場では、1 回目は飼槽や戻り通路などでヨーネ菌遺伝子が高率に検出され、2 回目はパーラーでのみ検出された。また、1 回目の採材時に高排菌牛 (10^{-2} オーダー) が摘発された。C 農場では、1 回目の採材時に追跡牛の排菌は確認されなかったが、堆肥や飼槽などからは検出された。また、2 回目の採材時には検出率の上昇がみられ、排菌牛 (10^{-4} オーダー) が確認された（図 3）。

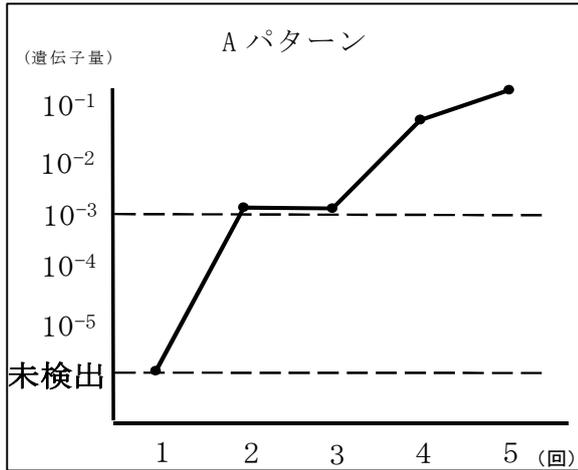


図 2-1 追跡牛検査成績 (特徴的なパターン)

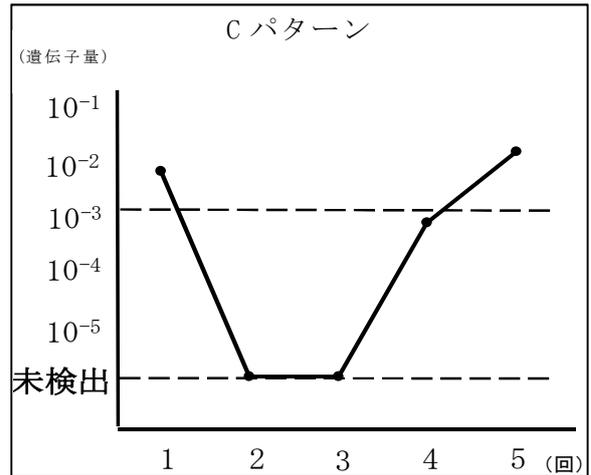


図 2-3

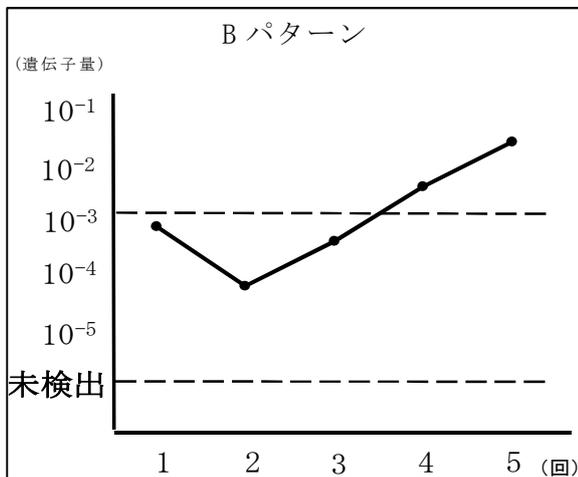


図 2-2

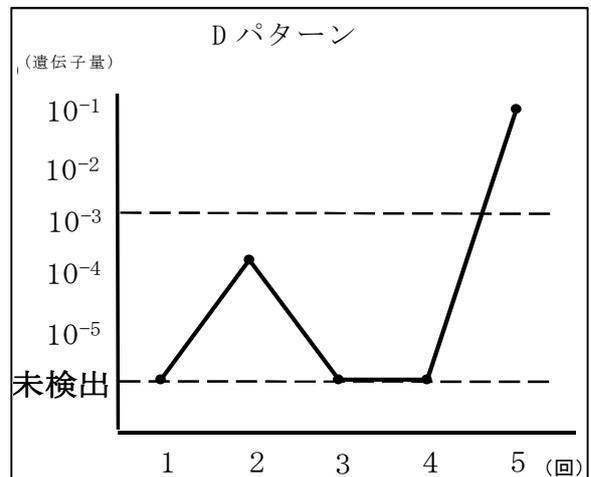


図 2-4

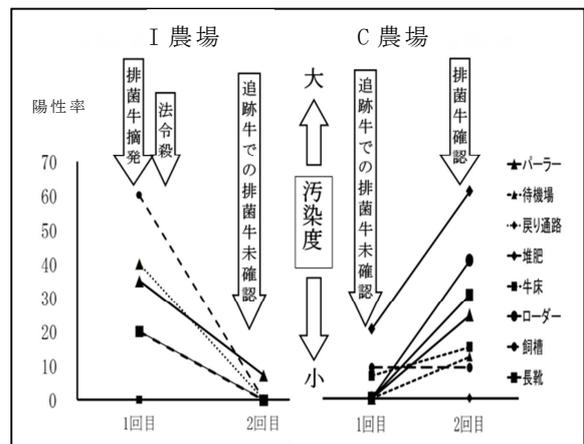


図 3 環境検査成績と排菌牛との関係

表 4 環境成績

フリーストール及びフリーバーン牛舎

農場	B	C	D	I	K
待機場	0/4 0.0	2/20 10.0	0/40 0.0	1/5 20.0	4/6 ^{※1} 66.7 ^{※2}
戻り通路	2/16 12.5	0/20 0.0	1/10 10.0	2/5 40.0	3/8 37.5
パーラー	0/40 0.0	2/10 20.0	NT	7/20 35.0	7/9 77.8
堆肥	0/4 0.0	2/4 50.0	0/4 0.0	0/3 0.0	3/4 75.0
牛床	NT	8/65 12.3	NT	5/25 20.0	11/12 92.0
ローダー	NT	1/3 33.3	NT	0/3 0.0	3/3 100.0
飼槽	NT	2/27 7.4	NT	6/10 60.0	2/3 66.7
長靴の底	NT	1/4 25.0	NT	0/2 0.0	2/3 66.7
その他	NT	0/30 0.0	NT	NT	5/15 33.3
陽性/検体数 陽性率	2/64 5.36	18/183 9.8	1/54 1.9	21/73 28.8	40/63 63.5

※1 陽性/検体数

※2 陽性率(%)

つなぎ牛舎

農場	M	N
堆肥	2/2 100.0	2/2 100.0
ロストル	0/12 0.0	8/8 100.0
ローダー	1/3 33.3	3/3 100.0
飼槽	3/10 30.0	7/7 100.0
長靴の底	1/3 33.3	3/3 100.0
バーンクリーナー	NT	2/2 100.0
運動場	0/2 0.0	2/3 66.7
牛床	1/3 33.3	NT
陽性/採材数 陽性率	8/35 22.9	27/28 96.4

(4) 畜舎消毒後の成績：

K農場での畜舎消毒後の検査では、消毒後4日まで 10^{-4} オーダーで異なる牛で1日1頭ずつ計3頭検出されたが、その後全く検出されなかった。石灰混合試験では、遺伝子検出量が0.1g混合で約1割に減少し、0.5gではさらに1割減少し、1g以上では検出されなかったため、環境の再検査は実施しなかった。

まとめ及び考察

本県は、これまでヨーネ病清浄化の推進を図ってきたが、平成23年度までは排菌牛の自主とう汰が進まず、早期清浄化が困難な状況となっていた。

平成24年度に検査対象を絞り込むためrPCR検査によるカテゴリーII農場の全頭検査を実施したことで、追跡牛の頻回検査で効率的に患畜の摘発ができたと考えられる。また、定量陽性にならないものの複数回遺伝子が検出された個体については、畜主が検査結果を信頼し自主とう汰を促進する結果となった。しかし、個体ごとの経時的な排菌量の推移が様々であるため、1回のみでの検査では排菌牛の特定が困難であることも判明した。

導入牛検査により、特に自家育成牛の少ない大規模農場では、継続的に実施することで、感染牛の侵入リスクを下げる事が可能と考えられた。

環境検査は、ヨーネ菌遺伝子の検出状況の推移で排菌牛の有無を推定できる可能性があり、高率に排菌牛を摘発できる時期の特定に有効であると考えられた。糞便検査では、通過菌による誤診が懸念されているが、環境のヨーネ菌による汚染を把握することにより、通過菌の検出の指標とすることができ、正確な診断結果へ補助的に活用できることがわか

った。また、畜舎消毒を加えることにより、ヨーネ菌遺伝子を環境から経口摂取する可能性を激減させ、誤診防止の一助となることが判明した。

これらの取り組みにより、確実に畜主の早期とう汰を含む清浄化への理解が向上したことから、検査への自主性や協力姿勢にも明確な変化が感じられるようになった。

今後は、環境検査の例数を増やしてより精度を向上させるとともに、排菌量の多い時期にあわせた検査体制を検討し、ヨーネ病の真の早期清浄化を目指したい。

参考文献

- 1) R. D. Berghaus, et al. 2006. J. Dairy Sci. 89 :963-970
- 2) E. A. Raizman, et al. 2004. J. Dairy Sci. 87 :2959-2966
- 3) 久保卓司ら. 2009. 第 51 回栃木県畜産関係業績発表会集録. 17-22
- 4) 梅木英伸ら. 平成 21 年度大分県家畜保健衛生並びに畜産関係業績発表会集録(2009)
- 5) 太田土美ら. 2012. 第 54 回茨城県家畜保健衛生業績発表会集録. 1-7
- 6) (独)動物衛生研究所ヨーネ病研究チーム : ヨーネ病検査マニュアル 2013. 3. 29 版
- 7) 鶏病研究会. 1998. 鶏卵・鶏肉のサルモネラ全書. 129-130. (株)日本畜産振興会