

7 スクリーニング遺伝子検査法を活用した牛ヨーネ病高度汚染農場における早期清浄化へ向けた取り組み

釧路家畜保健衛生所

○福田 寛 末永 敬徳
室田 英晴 枝松 弘樹¹⁾
¹⁾ 現石狩家畜保健衛生所

はじめに

牛ヨーネ病（本病）の糞便を用いたスクリーニング遺伝子検査法（sPCR）は、糞便 10 検体ずつのプール検体を作成し、ヨーネ菌遺伝子をターゲットとしたスクリーニングリアルタイム PCR（プール糞便検査）を実施する。陽性となったプール検体は、個体毎のスクリーニングリアルタイム PCR（個別糞便検査）を実施することで排菌牛を特定する手法である[1]。個別糞便検査陽性牛は、患畜決定のための家畜伝染病予防法施行規則に基づくリアルタイム PCR（確定検査）を行うことで、患畜を早期に摘発することができる。そのため、sPCR は、北海道ヨーネ病防疫対策実施要領（道要領）に基づく対策と併用することで、多検体においても処理の省力化を図りながら、本病早期清浄化への寄与が期待される手法である（図 1）。今回、sPCR を導入したヨーネ菌高度汚染農場の早期清浄化へ向けた取り組みについて報告する。

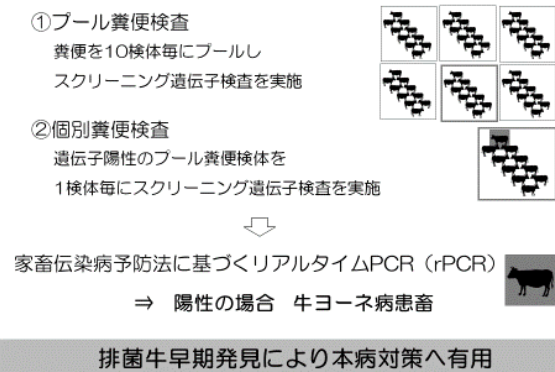


図 1 スクリーニング遺伝子検査法

I 概要

平成 29 年 10 月、乳用牛約 400 頭を飼養する酪農場からと畜場に出荷した乳用牛 1 頭が本病と診断された。家畜保健衛生所（家保）は出荷元農場に立ち入りを行い、地域自衛防疫組合（自防）立ち会いのもと、飼養者に家畜伝染病予防法第 51 条に基づく同居牛検査の実施を打診し、対策を実施することとなった。平成 29 年 11 月に発生時同居牛検査を実施したところ、確定検査で患畜 6 頭を摘発したため、本農場では道要領に則る対策を開始した。飼養者は本病の早期清浄化を強く望んでおり、感染牛を早期に特定するための積極的な対策を強く希望した。自防と協議の上、感染牛摘発を最優先とすることとし、国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門と連携しながら、第 2 回の同居牛検査より sPCR を導入した。

II 防疫対応

1 第1回 sPCR 検査

平成30年2月、sPCR導入初回の同居牛検査では、386頭の糞便から39検体のプール検体を作成し検査を実施したところ、プール糞便検査で100%が陽性となり、その個別糞便検査で68.7%（265検体）が陽性となった。検査結果が高陽性率となった要因の1つとして、個別糞便検査陽性牛のなかにヨーネ菌を大量に排菌している牛（高度排菌牛）が存在することで、農場内の環境が高度に汚染されていることが考えられた。その結果、個別糞便検査で陽性となった検体の多くは環境に由来するヨーネ菌を一時的に排菌している可能性が示唆された（図2）。

そこで、第1回 sPCR 検査では、ヨーネ菌の主たる汚染原因と考えられる高度排菌牛の優先的な対策を行い、さらに汚染された環境の対策を実施することとした。

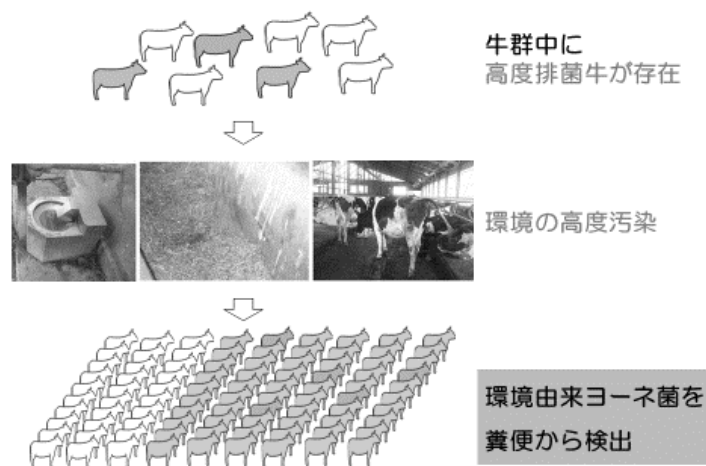


図2 sPCR 高陽性率の要因の検討

(1) ハイリスク牛対策

第1回 sPCR 検査では、検査結果を感染牛特定のための検査成績として、正確に解釈することが困難であったため、環境の汚染状況の改善が見込まれるまでは、高度排菌牛特定のため、個別糞便検査で使用する弱陽性対照の遺伝子（WPC）の増幅サイクル数（Ct 値）を指標として、WPC の Ct 値以下の高度排菌が疑われる牛をハイリスク牛とし、優先的に確定検査を実施することとした。第1回 sPCR 検査では、個別糞便検査陽性牛のうち、5頭がハイリスク牛に該当（道要領に則る検査で摘発された患畜を除く）。5頭全ての確定検査を実施し、3頭が患畜となった。

(2) 環境対策

上記より、農場内の環境がハイリスク牛の排菌したヨーネ菌で高度に汚染されている可能性が示唆されたため、環境改善に取り組んだ。平成30年4月、農場内の汚染場所を確認し、効果的な環境改善に生かすため、環境検査を実施した。41か所の環境材料において、遺伝子検査を実施したところ、飼槽、水槽を含む10か所が陽性となった。環境検査の結果に基づき、清掃、消毒の重点ポイントを確認した。重点ポイントは、ヨーネ菌に感受性の高いとされる若齢牛が飼養されている分娩舎や哺育・育成舎とした。平成30年5月、2日間にわたる清掃消毒を自防が主体となり、飼養者、家保と共同で実施した。

清掃消毒の効果判定を目的とした環境検査では、飼槽、水槽は全検体が陰性となり、10か所の陽性か所は3か所に減少した。また、継続的に環境の改善に取り組むため、定期的に環境検査を実施し、改善ポイントについて精査した。精査した内容を生産者にリーフレットで提示した上、さらに口頭で指導することで、継続的な環境改善を図れる

今回の環境検査の結果を踏まえた今後のヨーネ病対策方針

平成31年4月25日
飼育衛生保健衛生所

環境リスクのコントロール

(1) 哺育・育成牛対策
目的：【感受性の高い哺育・育成牛へのヨーネ病感染リスクの低下】
※次世代のヨーネ病感染を発生させないことが大切

方法：哺育舎の消石灰散布（消毒）
※新着牛のついでによる環境汚染度の低下
：パドックの試験消毒による汚染体の滞留を防止
：△採食場・休憩場の清掃・消毒の徹底（感染抑制）
：哺育・育成牛舎専用の靴の着用、靴底消毒の追加設置
：水槽の清掃（定期的なゴミ、こびりつきを除去）
可能な消毒（アルコール）

(2) 産妊牛、乾乳牛、搾乳牛対策
目的：【水質、糞便感染の防止】
方法：パドック、通廊（バーンツリーナーの駆除後10分）、
パドック、給水設備（清掃）・消石灰散布（消毒）
：飼槽・水槽の洗浄性維持・ロボット搾乳の定期的清掃
※感受性の高い新生子牛が生まれる乾乳牛舎が重要
：牛舎入り口への踏み込み消毒機の設置
：牛舎から移動するときに履く靴のリスクを減少

(3) 環境検査の実施
目的：環境中のヨーネ菌の汚染状況の把握
機関：次回検査（8～9月）時期に実施。結果により清掃・消毒ポイントの確認



定期的な環境検査を実施

リーフレットを作成
強化ポイントの提示

日頃の清掃、消毒に活用

陽性箇所は1～3カ所に減少

図3 環境改善に向けた取り組み

る体制を構築した（図3）。体制構築後、環境検査の陽性か所は1～3か所に減少した。

2 第2回及び第3回 sPCR 検査

平成30年6月、第2回 sPCR 検査を実施。374頭の糞便から38検体のプール検体を作成し、プール糞便検査を実施したところ65.8%（25検体）、個別糞便検査で11.5%（43検体）が陽性となり、ハイリスク牛は4頭であった。第2回 sPCR 検査のプール糞便検査結果は、環境中の汚染が未だに影響していると推察されたため、ハイリスク牛4頭の優先的な確定検査を実施し、全頭が患畜となった。

平成30年10月、第3回 sPCR 検査を実施。380検体の糞便から38検体のプール検体を作成し、プール糞便検査で52.6%（20検体）、個別糞便検査で7.4%（28検体）が陽性となり、ハイリスク牛は1頭であった。プール糞便検査の陽性率は50%以上であることから、未だ環境中の汚染が検査結果に影響していると判断。ハイリスク牛の優先的な確定検査を実施し、患畜として摘発した（表1）。

表1 第2回検査及び第3回 sPCR 検査成績

実施時期	① H30.2	② H30.6	③ H30.10
検査頭数	386	373	380
プール 陽性数	39	25	20
糞便 陽性率	100.0	65.8	52.6
個別 陽性頭数	265	43	28
糞便 陽性率	68.7	11.5	7.4
ハイリスク牛	5	4	1
確定検査頭数	5	4	1
患畜頭数	3	4	1

3 第4回及び第5回 sPCR 検査

平成 31 年 1 月、第 4 回検査を実施。405 頭の糞便から 41 検体のプール検体を作成し、プール糞便検査で 36.6% (15 検体)、個別糞便検査で 3.0% (12 検体) が陽性となり、ハイリスク牛は検出されなかった。プール糞便検査陽性率の減少、ハイリスク牛がいなくなり、かつ環境検査の陽性か所が減少したことから、環境の汚染状況が改善されたと判断した。

そのため、本検査では、個別糞便検査陽性牛全 12 頭の確定検査を実施することとし、2 頭の患者を摘発した。

令和元年 5 月、第 5 回 sPCR 検査を実施。412 頭の糞便から 42 検体のプール検体を作成し、プール糞便検査で 26.8% (11 検体)、個別糞便検査で 3.2% (13 検体) が陽性となり、ハイリスク牛は検出されなかった。個別糞便検査陽性牛全 13 頭の確定検査を実施し、2 頭の患者を摘発した (表 2)。

表 2 第 4 回検査及び第 5 回検査成績

実施時期	④ H31.1	⑤ R1.5
検体数	405	412
プール糞便		
陽性数	15	11
陽性率	36.6	26.8
個別糞便		
陽性頭数	12	13
陽性率	3.0	3.2
ハイリスク牛	0	0
確定検査頭数	12	13
患者頭数	2	2

III sPCR の検査成績推移と患者の摘発状況

第 1 回 sPCR 検査では、プール糞便検査陽性率が 100%、個別糞便検査では飼養頭数の 68.7% にあたる 265 頭が陽性という状況であり、感染牛特定のための検査結果の解釈ができなかった。感染牛が特定できないため、第 3 回 sPCR 検査までの間は、環境の汚染状況を勘案し、WPC の Ct 値を基準として設定したハイリスク牛について優先的な確定検査を実施した。

第 4 回 sPCR 検査以降はプール糞便検査の陽性率が減少、ハイリスク牛が検出されなくなり、環境の汚染状況も改善されたと判断し、個別糞便検査陽性牛全頭の確定検査を実施した。

第 5 回 sPCR 検査では、プール糞便検査陽性率は 26.8% まで減少。第 1 回検査と比較し、個別糞便検査陽性牛は 200 頭以上減少した。ハイリスク牛については第 3 回検査以降検出されない状況となった (図 4)。

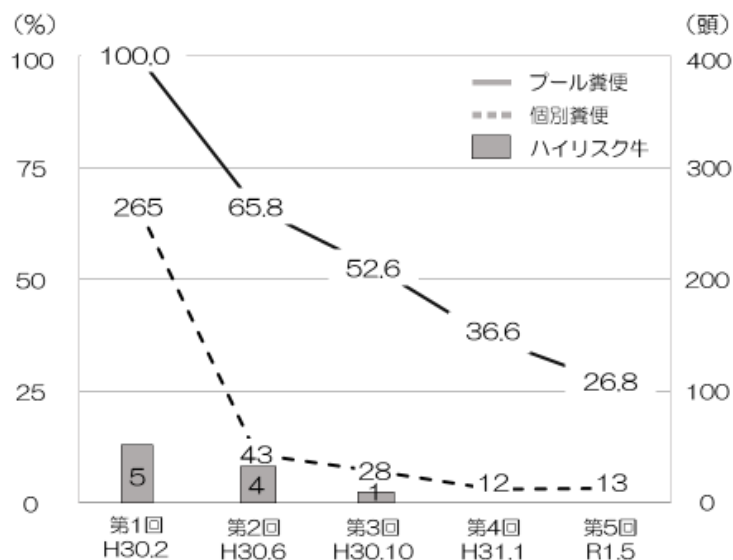


図 4 sPCR 法の検査成績の推移

また、道要領に則った検査では患者は発生時の同居牛検査で7頭（確定検査6頭、培養検査1頭）、第1回検査で9頭（確定検査1頭、培養検査8頭）摘発されたが、その後は第4回検査で患者1頭のみが摘発されている（図5）。なお、sPCRを活用して摘発された患者の血液スクリーニング検査は全て陰性であった。

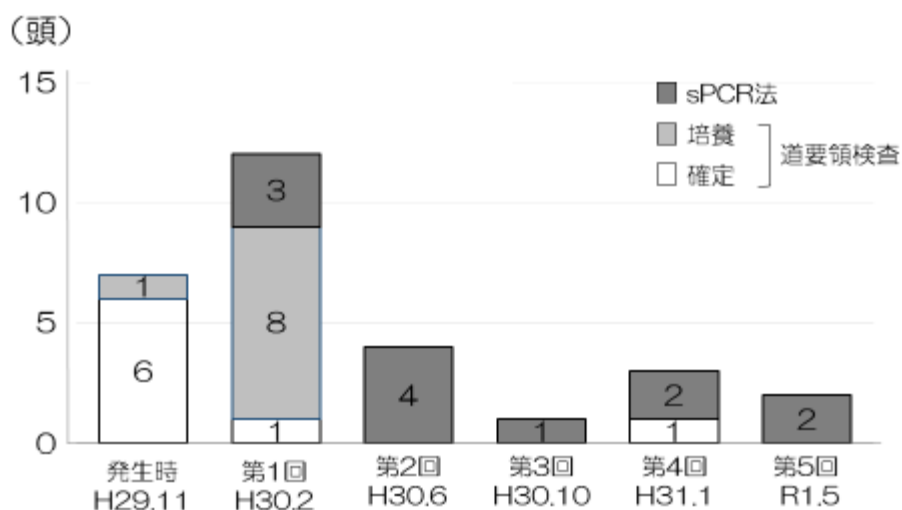


図5 患者の摘発状況

IV 考察と今後の展望

本農場は過去20年以上、外部から牛を導入しておらず、これまで本病の発生はなかった。また、平成26年度に実施した家畜伝染病予防法5条に基づく血液スクリーニング検査においても、全頭陰性を確認していた。しかし、その3年後の平成29年にはと畜場で本病の患者が摘発された。第1回sPCR検査で個別糞便検体の68.7%からヨーネ菌遺伝子が検出された。本事例のように環境中のヨーネ菌の高度汚染が遺伝子検査の結果に反映され、検査結果が高陽性率になったと考えられる事例はこれまでも報告がある[2]。

本病の一般的な性質として、感染牛の液性免疫応答（抗体価上昇）が始まる時期は排菌を始める時期よりも遅れることが知られており[3]、抗体価が上昇していない排菌牛の早期発見には、現行の抗体を標的とした血液スクリーニング検査に加えて、sPCRや確定検査のような抗原検査を組み合わせることが有用と考えられる。一方、本事例のようにsPCRを含めた遺伝子検査は、農場環境のヨーネ菌汚染状況を直接的に反映する可能性がある。そのため、遺伝子検査を本病対策に導入する際には、ハイリスク牛の存在や環境の汚染状況といった農場の背景を十分に精査する必要がある。本事例は本病対策に遺伝子検査を導入するにあたり、ハイリスク牛対策や環境対策の重要性を示す結果となった。また、同じ遺伝子検査でもsPCRと確定検査では、結果に相違が生じることがあるため、飼養者をはじめとした関係機関に対して、予め十分な説明と理解が求められる。

本農場では、第1回sPCR検査結果はハイリスク牛の存在と環境の高度汚染のために、感染牛の特定のためのsPCRの結果の解釈が困難となり防疫対応に苦慮した。そのため、第3回検査までは、sPCRを環境汚染の指標及びハイリスク牛検出の手段として活用し、ハイリスク牛対策と環境改善を重点として防疫対策を開始した。この方針で約1年間の対策を実施したところ、第4回検査以降は環境の汚染状況は大きく改善

され、ハイリスク牛は検出されない状況となった。その後の検査については、本法の主旨である個別糞便検査陽性牛全頭の確定検査を実施し、抗体陰性牛の中から早期に患畜を摘発している。

これまで本農場では本病の早期清浄化に向けた防疫対応を飼養者、自防、家保の3者で、緊密に協議を重ねながら実践してきた。今後も関係機関と緊密な連携を図りながら、本病早期清浄化を目指していく。

稿を終えるにあたり、本発表に多大な助言を賜りました 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 細菌・寄生虫研究領域 ヨーネ病ユニットの川治聡子主任研究員、永田礼子主任研究員に深謝いたします。

引用文献

- [1] 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：ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法
- [2] 宮田 基、佐竹 吉人、宮本 賢一、他：埼玉県調査研究成績報告書（家畜保健衛生業績発表集録）第56報（平成26年度）
- [3] 永田礼子：日獣会誌 69 66～68（2016）