

原 著

岩手県における肉用牛のヨーネ病対策の成果と課題

井戸 徳子, 佐藤 裕夫, 佐々木 幸治, 長山 玲子, 昆野 勝,
大山 貴行, 熊谷 芳浩, 高橋 真紀, 八重樫 岳司, 千葉 伸

要 約

平成20年度から23年度にかけて、家畜伝染病予防法に基づき6,652戸39,346頭の本県肉用繁殖牛についてヨーネ病検査を実施し、27戸40頭の患畜及び23戸34頭の自主淘汰牛を診断した。患畜40頭中33頭(82.5%)、自主淘汰牛34頭中24頭(70.5%)では、PCR、細菌分離、病理検査などELISA以外のいずれかの検査により本病の感染を示す所見が認められた。病変を有する患畜及び自主淘汰牛には、糞便のリアルタイムPCRにより、淘汰基準値に近い 10^{-3} pg/well以上の遺伝子量が認められた。以上より、患畜及び淘汰対象牛が的確に診断及び淘汰され、本県の肉用牛における本病清浄化が確実に推進されたものと思われた。

キーワード：肉用牛，ヨーネ病，リアルタイムPCR，*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

ヨーネ病は*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) の感染によって起こる数年の長い潜伏期と難治性の下痢及び消瘦を特徴とする反芻獣の慢性消耗性疾患である [1, 2]。牛では泌乳量の低下、増体率の低下及び淘汰等により多大な経済的損害をもたらされる [2-4]。特に和牛では、感染母牛からの長期哺乳と接触によって重度に感染し、乳牛と比較して進行が早く、生産性への影響が大きいことが知られている [3]。高橋ら [3] は、肉用一貫経営農場における発生事例から、1頭あたりの損失額を増体減少が98,200円、早期淘汰が383,000円と算出している。

岩手県では乳用牛を対象に、家畜伝染病予防法(法)第5条に基づく検査と防疫対策により、平成10年度から清浄化を進めてきたが、平成16年度以降、肉用牛での本症の発生事例が増加した(図1)。畜産県を標榜する本県では、肉用牛のブランドイメージを死守し、安定生産及び供給を維持するため、早急に本症の防疫対策を確立する必要性に迫られた。そこで、平成20年度から肉用牛を対象とした法5条に基づくヨーネ病検査(5条検査)を開始し、平成23年度までに6,652戸39,346頭を検査し、1クール目を終了した。平成24年度以降は、5年間隔で第2クール目の本検査を継続している。今回、肉用牛繁殖農場における県内一巡の検査が終

了したことから、本病の今後の防疫対策に資することを目的に、患畜及び自主淘汰牛の病性鑑定成績並びに発生農場での追跡検査成績を整理したので報告する。

材料及び方法

患畜：平成20年度から23年度の間、岩手県内で本病と診断された肉用牛27戸40頭を検査に用いた。

自主淘汰牛：患畜が摘発された農場の検査において、患畜産子、糞便中Map遺伝子量が基準値(5.0×10^{-3} pg/well)以上の牛(基準値以上牛)及び疫学的に強

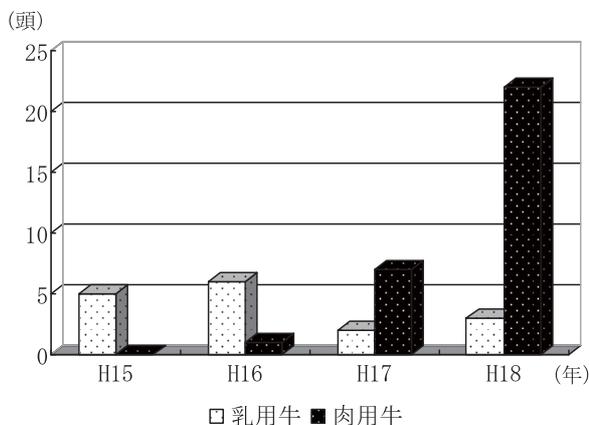


図1 岩手県のヨーネ病発生状況 (H16-H18)

表1 患畜及び自主淘汰牛の検査項目及び摘発頭数

(1)患畜

検査項目				患畜区分			計 (%)
ELISA	rPCR	培養	病理	5 条	51 条	病鑑	
+	+	+	+	16	11	2	29 (72.5)
+	+	+	-	0	2	0	2 (5.0)
+	-	-	+	1	0	0	1 (2.5)
+	+	-	-	1	0	0	1 (2.5)
+	-	-	-	7	0	0	7 (17.5)
計				25	13	2	40

(2)自主淘汰牛

検査項目				自主淘汰区分			計 (%)
ELISA	rPCR	培養	病理	患畜産子	基準値以上	その他	
-	+	+	+	5	4	2	11 (32.4)
-	+	+	-	3	1	2	6 (17.6)
-	+	-	-	0	1	0	1 (2.9)
-	-	+	-	1	0	0	1 (2.9)
+	+	+	-	5	0	0	5 (14.7)
-	-	-	-	10	0	0	10 (29.0)
計				24	6	4	34

く感染が疑われる牛（その他疫学関連牛）の計23戸34頭を自主淘汰牛として検査に用いた。

細菌学的検査：法5条及び51条に基づく発生農場の追跡検査（51条検査）における抗体検査は、家畜伝染病予防法施行規則別表第1に基づき、血清を用いてヨーネスクリーニング・プルキエ（株）京都微研）によるスクリーニングELISA検査を実施後、陽性を示した検体についてヨーネライザII（共立製薬株）による確定ELISA検査を行った。51条検査における糞便中ヨーネ菌遺伝子量は、（独）動物衛生研究所が示すヨーネ病検査マニュアル（マニュアル）に基づきリアルタイムPCR法（rPCR）により測定した。本検査は、発生から1年以内は3カ月間隔で実施し、続発がない場合、2年目以降は6カ月間隔で実施した。患畜及び自主淘汰牛の精密検査は、剖検後、マニュアルに基づき空腸から回盲部にわたる腸粘膜及び付属リンパ節並びに乳房リンパ節、盲腸及び直腸内容について、rPCR及び分離培養を行った。

病理組織学的検査：患畜及び自主淘汰牛は、マニュアルに基づき、空腸から回盲部にわたる腸粘膜及び付属リンパ節から得た検査材料を10%緩衝ホルマリン液で固定し、定法に従いヘマトキシリン・エオジン染色及び抗酸菌染色標本を作製した。病変の程度により、重度（空腸から結腸に至る広範な病変）、中等度（空腸から回盲部に至る病変）、軽度（空腸または回腸の一部に限局した病変）、無病巣（病変が全く認められなかったもの）に分類した。

成 績

患畜及び自主淘汰牛の摘発と防疫対策の状況：患畜および自主淘汰牛の検査項目および摘発数を表1に示した。4年間で27戸40頭の患畜を摘発した。患畜の摘発根拠の内訳は、5条検査が25頭、51条検査が13頭、病性鑑定が2頭であった。5条検査における摘発率は、戸数ベースで0.3%、頭数ベースで0.06%であった。発生農場のうち、23戸34頭を自主淘汰牛として処分した。その内訳は、患畜の産子が24頭、基準値以上を示した牛が6頭、その他疫学的に関連があった牛として4頭を淘汰処分した。その結果、発生農場27戸のうち、18戸は平成24年3月までに岩手県牛ヨーネ病防疫対策要領に基づき清浄化が達成された。

患畜及び自主淘汰牛の病性鑑定成績：患畜は、40頭中33頭（82.5%）でELISA以外のrPCR、培養又は病理検査のいずれかに陽性を示す所見が認められた。そのうち、29頭（72.5%）が全ての検査項目で陽性、2頭（5%）がrPCR及び培養のみ陽性、1頭（2.5%）がrPCRのみ陽性、1頭（2.5%）が病理検査のみ陽性であった。病理検査で病変が認められなかったもののうち、3頭がrPCR又は培養で陽性、7頭（17.5%）がELISAのみ陽性であった。

自主淘汰牛では、34頭中24頭（70.5%）がrPCR、培養又は病理検査のいずれかで陽性の所見が認められた。そのうち、11頭（32.4%）がrPCR、培養及び病理検査で陽性、6頭（17.6%）がrPCR及び培養で陽性、1頭（2.9%）がrPCRのみ陽性、1頭（2.9%）が培養のみ陽

表2 各検査項目の陽性頭数

(1)患畜

検査項目	材 料	患 畜 区 分			計 (%) n=40
		5 条 n=25	51条 n=13	病鑑 n= 2	
ELISA	血 清	25	13	2	40 (100)
rPCR	臓 器	17	13	2	32 (80.0)
	糞 便	16	6	2	24 (60.0)
培 養	臓 器	16	13	2	31 (77.5)
	糞 便	16	8	2	26 (65.0)
病 理	臓 器	17	11	2	30 (75.0)

(2)自主淘汰牛

検査項目	材 料	自 主 淘 汰 区 分			計 (%) n=34
		患畜産子 n=24	基準値以上 n= 6	その他 n= 4	
ELISA	血 清	5	0	0	5 (14.7)
rPCR	臓 器	13	6	4	23 (67.6)
	糞 便	7	4	2	13 (38.2)
培 養	臓 器	14	5	4	23 (67.6)
	糞 便	10	4	0	14 (41.2)
病 理	臓 器	5	4	2	11 (32.4)

表3 病変の程度と糞便中のrPCR値 (pg/well)

(1)患畜

病 変	患 畜 区 分			計 (%)	糞便中の rPCR値
	5 条	51 条	病 鑑		
重 度	8	2	2	12 (30.0)	1.6×10^1
中 等 度	8	9	0	17 (42.5)	8.6×10^{-3}
軽 度	1	0	0	1 (2.5)	検出されず
無 病 巢	8	2	0	10 (25.0)	検出されず
計	25	13	2	40	

(2)自主淘汰牛

病 変	自 主 淘 汰 区 分			計 (%)	糞便中の rPCR値
	患畜産子	基準値以上	その他		
重 度	0	1	1	2 (5.9)	4.8×10^{-2}
中 等 度	3	2	1	6 (17.6)	6.5×10^{-3}
軽 度	2	1	0	3 (8.8)	1.1×10^{-3}
無 病 巢	19	2	2	23 (67.6)	1.5×10^{-2}
計	24	6	4	34	

性であった。5頭(14.7%)がELISA, rPCR及び培養が陽性であった。全ての検査で陰性であったのは10頭(29.4%)あった。

各検査項目の陽性頭数：患畜は、32頭(80%)が臓器のrPCRで陽性を示した(表2)。次いで、臓器の分離培養が31頭(77.5%)、病理検査が30頭(75%)、糞便の分離培養が26頭(65%)で陽性となった。近年、患畜の確定基準として検討されている糞便のrPCRは24頭(60%)と最も低い陽性率を示した。

自主淘汰牛では、臓器のrPCR及び分離培養でそれ

ぞれ23頭(67.6%)が陽性を示した。次いで糞便の分離培養が14頭(41.2%)、糞便のrPCRが13頭(38.2%)、病理検査が11頭(32.4%)で陽性となった。

病変程度と糞便中のMap平均遺伝子量(rPCR値)：患畜40頭のうち、12頭(30%)が重度病変を、17頭(42.5%)が中等度、1頭(2.5%)が軽度病変を示した(表3)。10頭(25%)は病変が認められない無病巢牛であった。これらの糞便のrPCR値は、重度病変では 1.6×10^1 pg/well、中等度では 8.6×10^{-3} pg/wellであり、軽度及び病変なしでは検出限界以下であった。

表4 51条検査における患畜及び自主淘汰牛の糞便中rPCR値の推移

	個体 No	追跡検査回数 (回目)										剖検時	
		1	2	3	4	5	6	7	8-9	10	11-14		
患畜	1	1.4×10^{-5}											-
	2	9.0×10^{-4}	7.1×10^{-5}	3.9×10^{-3}									9.6×10^{-3}
	3	-*	-	-	2.8×10^{-5}	2.1×10^{-4}	3.8×10^{-3}						245
自主淘汰牛 (基準値**以上の牛)	4	2.2×10^{-2}											6.2×10^{-4}
	5	2.18											4.24
	6	1.6×10^{-2}											3.2×10^{-2}
	7	2.4×10^{-4}	6.9×10^{-3}										-
	8	1.8×10^{-3}	6.8×10^{-3}										3.0×10^{-3}
	9	-	-	1.4×10^{-4}	5.0×10^{-4}	-	-	-	8.3×10^{-3}				3.0×10^{-3}
	10	6.25×10^{-3}	-	-	-	7.1×10^{-5}	-	-	-	1.3×10^{-4}	-		1.7×10^{-3}

* - : 検出限界以下

** 基準値 : 5.0×10^{-3} pg/well

自主淘汰牛34頭のうち、重度の病変を有していたのは2頭(5.9%)、中等度病変は6頭(17.6%)、軽度病変は3頭(8.8%)、無病巣が23頭(67.6%)であった。これらの糞便の平均rPCR値は、重度病変は 4.8×10^{-2} pg/well、中等度が 6.5×10^{-3} pg/well、軽度が 1.1×10^{-3} pg/well、無病巣が 1.5×10^{-2} pg/wellであった。51条検査における患畜及び自主淘汰牛の糞便中rPCR値の経時変化：51条検査で3頭(No.1~3)が患畜となり、7頭(No.4~10)が基準値(5.0×10^{-3} pg/well)以上を示し自主淘汰となった(表4)。これらの牛の糞便中rPCR値より、No.2, 3, 7, 8, 9の5頭は3カ月から1年半の間に遺伝子量の漸増が認められ、患畜又は自主淘汰対象となった。No.10は、初回検査時に基準値を超えていたものの、その後3年半の間、微量かつ間欠的な排菌を続けた。No.4, 5, 6の3頭は初回検査の時点で基準値を超えていた。

考 察

平成20年度から開始された肉用牛ヨーネ病防疫対策において、27戸40頭の患畜を摘発し23戸34頭を自主淘汰した。今回実施した5条検査開始前の時点では、国内の発生状況から摘発率を戸数ベースで1%と見込んでいたが、最終的には0.3%で第1クールを終了した。

患畜40頭中33頭(82.5%)及び自主淘汰牛34頭中24頭(70.5%)には、ELISA以外でも本病の感染を示す所見が認められ、感染牛が適切に摘発・淘汰されたことを裏付ける成績と思われた。自主淘汰牛の多くが明らかな感染の所見を有したことは、ELISAのみでの早期摘発と清浄化の難しさを裏付けるものであり、抗体検査では摘発できない感染牛がやがて汚染源又は患畜となり、農場の清浄化を遅延させる可能性を示している。

今回、積極的な自主淘汰が可能となった背景には、農場の負担を軽減しつつ早期の清浄化を推進するため、本病検査と同時に岩手県牛ヨーネ病発生農場清浄化促進対策事業(事業)を創設したことがあげられる。本事業は、県、生産者団体及び自衛防疫団体で構成する岩手県ヨーネ病発生農場清浄化促進対策協議会が、感染牛及び疫学関連牛の淘汰に対し評価額の9割までを助成するものであり、本事業は円滑な自主淘汰の推進に多大な貢献を果たした。摘発淘汰及び農場支援の両輪の対策が、早期清浄化を大きく促進したものと推察された。

自主淘汰基準値である糞便中のMap遺伝子量 5.0×10^{-3} pg/wellは、国のヨーネ病検査マニュアルにより、分離培養によりMapが $1 \sim 10^2$ CFU/tube分離される場合の遺伝子量、すなわち患畜となる遺伝子量とされている。患畜及び自主淘汰牛のうち、重度及び中等度の病変を有する牛は、いずれも 10^{-3} pg/well以上の値を示していた。とりわけ、重度病変を有する患畜では、平均で 10^1 pg/wellの遺伝子量(菌数に換算して 10^6 CFU/gの排菌量)が認められ、既報[4]における感染末期牛の排菌量と同等であった。Bradyら[5]は、腸管における肉眼病変の有無と同部位のMapの分離成績は一致することを報告している。以上より、糞便中からMap遺伝子が 10^{-3} pg/well以上検出される場合は、すでに腸管に病変が形成されている可能性が示唆された。

無病巣の自主淘汰牛で、 1.5×10^{-2} pg/wellと基準値以上のrPCR値が認められた。これらの牛は全て3カ月齢未満の患畜産子又は同居牛であった。感染母牛から哺乳した子牛は、生後2~6カ月にわたり一過性の排菌を示すことが報告されている[4]。無病巣にも関わらず基準値以上の遺伝子が検出された原因として、

感染牛からの哺乳及び接触により、一過性に大量の菌が摂取された可能性が考えられた。一般的な和牛農家では、このような3カ月齢未満の子牛は繋留されず、牛舎内を自由に動き回ることが多い。このことは、哺乳中の患畜産子が、病変の形成前に患畜と同程度に排菌し、Mapの牛舎内汚染を拡大させる可能性を示している。患畜産子又は感染が強く疑われる子牛については、早期に淘汰する本病防疫対策の重要性を示す成績と思われた。

法51条に基づく追跡検査では、患畜及び自主淘汰対象牛の的確な発見と淘汰が進み、早期清浄化に貢献したものとされた。一方、排菌期間や遺伝子量に一定のパターンは認められなかった。本病は不定期に排菌と休眠を繰り返す感染症であり [6]、経時的モニタリングにより排菌や患畜となる時期を推定することは困難と思われた。1頭は初回のみ基準値以上の排菌を示し、以降は3年半もの間、微量で間欠的な排菌を続けた。基準値未満であっても長期間の排菌が認められるなど、明らかに感染が疑われる牛は、可能な限り淘汰することが早期清浄化には望ましいと考えられた。

ELISA以外に本病の所見が認められない無病巣反応牛が、17.5%認められた。このような事例は旧来から報告されているが [4, 7]、多くは原因が明らかにされていない。現在、この対応案として農林水産省では、確定検査の診断基準をELISAに替えて糞便rPCRとするよう検討している。これは、ヨーネ菌以外の抗酸菌によるELISA非特異反応を回避するためであるが、今回得られた成績では、ELISA以外の検査で陽性が確認された患畜33頭中9頭 (27.3%) が糞便rPCR陰性であり、新たな診断基準では見逃されることになる。従って、単一の検査方法で本病を診断することは、患畜の見逃しを招く恐れがあることから、本病の診断は複数の検査方法により総合的に行うことが必要と思われた。

わが国における本病のサーベイランスは、乳用牛においてはほぼ全国で実施されているが、肉用牛については未実施の都道府県が多数を占め [8]、依然として県外からの侵入に対して警戒を解くことのできない状

況にある。本県では、今後も肉用牛及び乳用牛の両方で、5年間隔での県内全域の検査と防疫対策を進める予定であるが、県内全域の清浄化には少なくとも数クールの実施が必要と思われる。引き続き本病対策を継続し、清浄化を推進する。

引用文献

- [1] Harris NB, Barletta RG: Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine, Clin Microbiol Rev, 14, 489-512 (2001)
- [2] Tiwari A, John A. VanLeeuwen, Shawn L.B. McKenna, Greg P. Keefe, and Herman W. Barkema: Johne's disease in Canada: Part I: Clinical symptoms, pathophysiology, diagnosis, and prevalence in dairy herds, Can Vet J, 47, 874-882 (2006)
- [3] 高橋修, 伊藤格郎, 横溝祐一: ヨーネ病による経済的損害, 臨床獣医, 7, 59-64 (1989)
- [4] 横溝祐一: 牛のヨーネ病について, 日獣会誌, 38, 489-495 (1985)
- [5] Brady C, O'Grady D, O'Meara F, Egan J, Bassett H: Relationships between clinical signs, pathological changes and tissue distribution of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in 21 cows from herds affected by Johne's disease, Vet Rec, 162, 147-152 (2008)
- [6] 横溝祐一: ヨーネ菌とヨーネ病の特性について, 山口獣医学雑誌, 17, 1-26 (1990)
- [7] 矢部静, 本間裕一, 篠川有理, 会田恒彦, 太田洋一, 渡邊大成, 本間穂積: ヨーネ病多発大規模酪農場における細菌学的考察, 平成21年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録, 52-55 (2010)
- [8] 小林創太, 筒井俊之: わが国の牛ヨーネ病の発生動向と防疫体制の現状, 日獣会誌, 60, 853-857 (2007)