

### Ⅲ 家畜衛生業績発表会集録

#### 1 大規模農場におけるヨーネ病清浄化対策の問題点とその対応

県北家畜保健衛生所

市川優 小島浩一

##### はじめに

ヨーネ病は、ヨーネ菌を経口的に摂取することで感染し、長い潜伏期間の後に慢性下痢を発症する疾病で、法定伝染病に指定されている<sup>1)</sup>。

本病の診断は、抗体検査（ELISA）、糞便培養、ヨーニン反応及び遺伝子検査（リアルタイム PCR）で実施している。しかし、本病は菌の暴露後、発症までの潜伏期間が長いため、上記の診断法では、潜伏期間中の感染牛の摘発が困難である。さらに、感染牛からの排菌は、抗体検査で陽性となる以前から認められることが知られており、抗体検査だけでは排菌牛を見逃す可能性がある。

本病の清浄化対策は、平成 11 年に策定された「栃木県ヨーネ病清浄化対策実施要領」（以下、県要領）に基づき、ELISA 検査による対策を中心に講じてきたが、毎年のように患畜が発生し対象農場は増加していった。平成 20 年の県要領の改正により、清浄化対策にリアルタイム PCR 法を取り入れて以降、当所では糞便採取方法を工夫しながら、積極的にリアルタイム PCR を実施してきた<sup>2)</sup>。また、平成 24 年度には、清浄化対策農場の飼養牛全頭となる 6,000 頭以上についてリアルタイム PCR を実施し患畜基準値未満の遺伝子陽性牛（以下、追跡牛）を摘発してきた（図 1）。

リアルタイム PCR が公定法となった平成 25 年度からは、排菌牛の存在を推定する方法と

して、環境材料を用いたリアルタイム PCR を活用するとともに、追跡牛の継続検査を実施し、清浄化対策を進めてきた<sup>3)</sup>。

その結果、清浄化対策農場は減少し、平成 27 年 12 月現在、管内のヨーネ病清浄化対策実施農場は 6 農場となったものの、6 農場中 5 農場が大規模農場であり、大規模農場の本病清浄化が課題となっている。

そこで、今回我々は、大規模農場の清浄化対策について、乾乳牛を対象とした遺伝子検査を実施したので、その概要を報告する。



図 1 管内の清浄化対策農場の推移

##### 大規模農場の問題点

大規模農場の清浄化対策を県要領どおり実施すると、患畜摘発後、年 3 回の全頭検査をする必要がある。しかし、全頭を一斉に検査するには、牛の係留、移動、保定等、農家にも大きな負担が生じるため、検査実施の意義を十分に説明し、理解してもらう必要がある。また、検査法としては、飼養頭数が 1,000

頭を超える農場も存在するため、実際に実施できる検査としては、抗体検査でスクリーニング後、遺伝子検査を実施する方法となる。しかし、抗体検査では排菌牛を見逃す可能性があるため、抗体検査を主とした清浄化対策では、労力の割に必ずしも清浄化が進むとは言えず、農家の理解を得ることが困難となっていた。一方、遺伝子検査については、検査に時間を要するため生乳出荷の問題が浮上し、全頭を一斉に実施することは事実上困難である。また、一斉検査では、検査していない時期に排菌牛が分娩舎を汚染する可能性も考えられ、それにより、新たな感染牛を産出する危険性も出てくる。さらに、大規模農場では、導入が頻繁であることから本病の侵入リスクが高く、再び患者が発生すると全頭検査の労力が無駄となることが考えられる。

追跡牛については、基本的に自主とう汰を指導しているが、一度遺伝子が検出されたのみで、その後検出されない個体がほとんどである。そのため、自主とう汰に理解が得られず、追跡牛は検査の度に増加している。自主とう汰が進まない理由として、検出された遺伝子が排菌によるものか通過菌によるものかの判別が困難であることが挙げられる。

### 大規模農場の清浄化対応策

大規模農場については、平成 26 年度から、生乳出荷の制限を考慮する必要がない乾乳ステージの牛群を対象として、約 1 年間で全頭が検査終了となるようリアルタイム PCR を実施した (図 2)。

#### 1 乾乳牛及び追跡牛検査

乾乳牛及び追跡牛検査の流れを図 3 に示した。排菌牛の摘発のため、乾乳牛・追跡牛は、リアルタイム PCR (研究用試薬) を実施した。

乾乳牛の糞便採取は、農家の協力を得て乾乳時に採材したが、一部の農場では月に 1 回程度家保が採材した。なお、家保が採材する場合は ELISA 検査も併せて実施した。乾乳牛の検査の流れは、農家が採材した検体についてリアルタイム PCR (研究用試薬) を実施した。陽性個体については、約 2 週間の隔離飼育後、家保が再検査 (採血及び採糞) を実施した。その際、環境材料も併せて採取し、糞便の遺伝子量と比較した。環境材料は、紙製のブーツカバーをはいて牛舎内を歩き回り、付着した敷料等を検体とした。



図 2 大規模農場の清浄化対応策

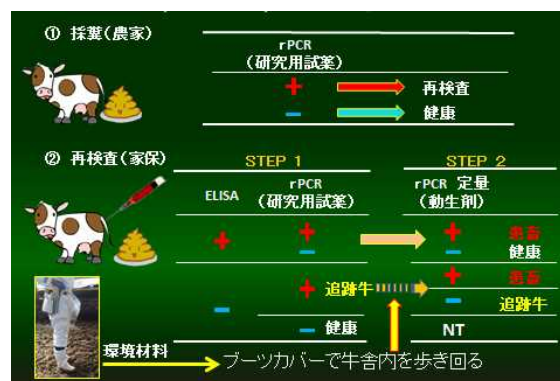


図 3 乾乳牛検査の流れ

再検査で抗体陽性の場合、動物用生物学的製剤指定のリアルタイム PCR を用いて定量検査を実施し判定した。一方、抗体陰性かつリアルタイム PCR 陽性 (研究用試薬) の場合は追跡牛とし、環境材料の遺伝子量 (研究用

試薬)と比較し、排菌か通過菌かを判断した。なお、排菌と判断した場合は、動物用生物学的製剤指定のリアルタイム PCR を用いて定量検査を実施した。

追跡牛は、ELISA 及びリアルタイム PCR を年 3 回程度となるよう定期的実施し、1 年以上経過観察した。なお、経過観察中に 3 回続けてリアルタイム PCR が陰性であった場合は健康牛とし追跡牛から除外した。

## 2 導入牛及び育成牛等の検査

農場への本病侵入防止のため実施した。検体は、導入時に農家が採材し、リアルタイム PCR を実施した。そのほか、育成牛等は、放牧や出荷前に ELISA、ヨーニン反応又はリアルタイム PCR 検査を実施した。

### 実施内容

大規模 5 農場における飼養頭数及び検査内容を図 4 に示した。

大規模 5 農場 A～E の飼養頭数は、それぞれ 1,300、1,100、800、500、350 頭で、乾乳牛検査に理解のある C 農場から検査を開始した。C 農場では約 1 年間家保が採材し、この間 15 頭の排菌牛を摘発し自主とう汰を実施した。その後は、農家が乾乳時に採材する方法へ移行した (図 4)。

A、B 及び D 農場は全頭の抗体検査実施後に乾乳時の採糞を開始した。E 農場については、開始当初は農家が採材することとしていたが、患畜が発生したため家保の採材に変更した。

そのほか、A、B 及び C 農場では導入牛検査、B 及び C 農場は育成牛等の検査を定期的実施した。追跡牛は、年に 3 回程度となるよう実施した。

農家に検体の採材協力を得たことで、継続

的に大規模農場の検査が可能となり、ELISA 及びリアルタイム PCR の検査実施頭数は、それぞれ平成 26 年度が、3,606 頭、2,219 頭、平成 27 年度 (11 月末時点) が 4,483 頭、2,479 頭であった。



図 4 各農場の実施内容

### 結果と考察

#### 1 乾乳牛及び導入牛

乾乳牛及び導入牛の検査結果を表 1 に示した。

平成 26 年 4 月から 27 年 11 月において、乾乳牛の ELISA 陽性率は 2.0% (150/7,542) で、リアルタイム PCR 陽性率は 5.4% (150/2,800) でありリアルタイム PCR の方が陽性率が高い傾向であった。農場別にみると、特に A、E 農場で顕著であった (ELISA 陽性率 0.4%、1.4%、リアルタイム PCR 陽性率 4.4%、30.3%)。これは、ELISA 検査ではリアルタイム PCR 陽性牛を見逃している若しくは排菌ではなく通過菌を検出している可能性が考えられた。

A 農場では患畜の摘発はないものの、導入牛のリアルタイム PCR 陽性率が 6.4% (36/559) と高く、導入牛によってヨーネ菌が農場内に持ち込まれていると推測された。また、E 農場は、ヨーネ病を発症した患畜 (自家産牛) が摘発されており、患畜の大量排菌

によって牛舎環境が汚染されたと考えられた。これらの要因によって、A, E 農場のリアルタイム PCR 陽性牛のほとんどは、通過菌が検出されている可能性が考えられた。

一方、C 農場では ELISA、リアルタイム PCR 共に陽性率がそれぞれ 5.6%、4.1% と高かったが、ELISA 及びリアルタイム PCR どちらも陽性となった個体は患畜となった 1 頭のみであった。

導入牛について、C 農場は、すべてが自家育成牛の預託放牧場からの下牧牛であり、リアルタイム PCR 陽性率は 0.0% (0/306) であった。一方、導入牛検査を実施したほかの A, B 農場は、それぞれ 6.4% (36/559)、0.6% (5/788) であったが、リアルタイム PCR 陽性の牛は、県外の市場で購入した牛であった。

表 1 検査結果 (乾乳牛・導入牛)

農場	成牛頭数	乾乳牛		導入牛 rPCR	市場 購入	患畜 頭数
		ELISA	rPCR			
A	1,300	0.4 (11/2,472)	4.4 (40/914)	6.4 (36/559)	あり	0
B	1,100	1.7 (38/2,120)	0.6 (4/700)	0.6 (5/788)	あり	0
C	800	5.6 (81/1,434)	4.1 (39/946)	0.0 (0/306)	なし	1
D	500	1.5 (15/1,011)	0.0 (0/19)	-	-	0
E	350	1.4 (7/505)	30.3 (67/221)	-	自家産	1
計	4,050	2.0 (150/7,542)	5.4 (150/2,800)	2.5 (41/1,853)		2

陽性率% (陽性/検査数)

## 2 A 農場の事例

導入牛で陽性が多かった A 農場の状況について図 5 に示した。

A 農場では、定期的に月に 30 頭程度導入していた。陽性牛の検出は、平成 26 年 4 月から 7 月、平成 27 年 4 月、7 月から 10 月と、ある時期に固まって摘発された。

導入牛の陽性率は、自家産が 5.3% (6/113)、市場購入牛が 6.7% (30/446) で、大きな違

いは認められなかった。A 農場は、県外に育成農場を所有しており、自家育成牛及び市場購入牛共に一定期間育成農場で飼養後、初妊牛として A 農場に転入していた。また、導入時に陽性であった牛は、追跡牛として再度検査すると、全て陰転した。これらのことから、県外の育成農場がヨーネ菌に汚染しており、通過菌が検出されていたと考えられた。

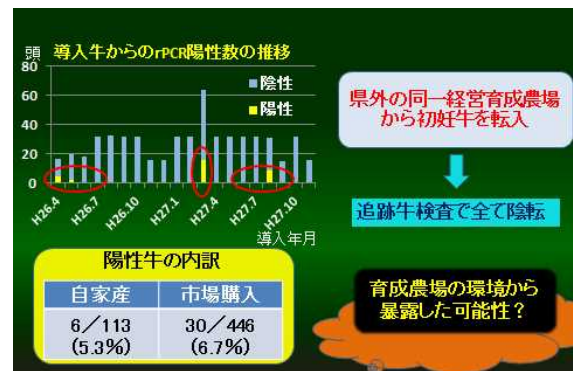


図 5 A 農場の事例

## 3 E 農場の事例

糞便と環境材料の遺伝子量の比較結果として、E 農場の事例を図 6 に示した。

大量排菌していた患畜が摘発された平成 27 年 7 月の検査では、乾乳牛舎の同居牛の全てから、患畜基準値以上の遺伝子量が検出された。



図 6 E 農場の事例 (糞便と環境材料の遺伝子量の比較)

環境材料の遺伝子量と比較したところ、患畜は環境の値以上であり、同居牛は環境材料の値未満であった。これは、高濃度に排菌していた患畜によって牛舎環境が汚染され、汚染された環境の影響を受けて通過菌として検出されていたと推測された。そのため、同居牛については経過観察とし、毎月検査を実施した。

患畜の殺処分後、環境の濃度が低下するとともに、同居牛の値も低下していき、11月には、ほぼ全ての同居牛が検出限界以下となった。また、11月に新たに乾乳した1頭が環境の値を上回ったため、排菌している可能性が高いと考えられ、当該牛1頭をとう汰した。とう汰後の12月には、乾乳牛舎の飼養牛全頭が検出限界以下となった。しかし、環境からは未だに検出されていたため、再度、徹底的な清掃消毒を指導した。

このように、環境材料の値と比較することにより、排菌と通過菌の区別が可能となり、効率的に排菌牛を摘発することができた。また、この結果を説明することによって農家の理解が得られ、分娩前の牛であっても農家は納得してとう汰した。

#### 4 追跡牛

追跡牛の頭数は、平成26年3月末に36頭存在していたが、乾乳牛検査で136頭、導入牛で40頭が新たに増加した。これらのうち（公社）栃木県畜産協会が実施する「家畜生産農場清浄化支援対策事業」を活用して淘汰したのは24頭となった。なお、死亡・廃用となったのは26頭であった。

一方、健康牛に回復したのは31頭で、平成27年11月末で追跡牛は131頭存在している。なお、筆者らは、これら追跡牛のほとんどが、

環境からの影響を受けて通過菌としてその遺伝子が検出されたものと考えている。

#### まとめと考察

今回、筆者らは、大規模農場における本病清浄化への問題点を解決するため、乾乳牛検査及び環境材料の検査を組み合わせる清浄化対策に取り組んだ。

その結果、乾乳牛と環境検査の遺伝子量を比較することで、排菌牛を効率的に摘発することができた。また、分娩前にとう汰することが可能となり、分娩牛房のヨーネ菌汚染及び最も感染リスクが高いといわれている新生子牛への新たな感染を防止することができたと思われる。

さらに、ヨーネ病で問題となる通過菌についても、検査実施方法の検討や検査結果の解析によって、検出されたヨーネ菌遺伝子が排菌か通過菌によるものかの推定が可能となった。このことから、検体の採取や、排菌牛の自主とう汰について農家の理解・協力が得られたと思われる。

大規模農場における本病の清浄化には、その農場の発生状況や導入状況など実態に合った清浄化対策を農家と一緒に考える必要がある。今回の方法を用いて、大規模農場の清浄化対策を実施してきたが、農家の清浄化への意識は着実に高くなったと思われる。

しかし、今回の方法は、県要領に規定されていないものであり、真の清浄化が進んでも県要領上は清浄化達成とみなされず、清浄化までのゴールは不透明な状況である。

今後は、今回報告した方法が県要領に組み込まれるよう、さらにデータを蓄積するとともに、農家と共に協力し合いながら大規模農

場における本病清浄化の推進を継続していきたい。

#### 参考文献

- 1) 森康行:家畜診療 58 卷 3 号, 139-145, 2011  
獣医感染症カラーアトラス(第 2 版), 367-368
- 2) 蓼沼亜矢子ら:第 53 回栃木県家畜衛生業績発表会集録, 1-5, 2011
- 3) 黒川由貴江ら:第 55 回栃木県家畜衛生業績発表会集録, 5-10, 2013