

## 4. リアルタイムPCRを用いた酪農家における牛ヨーネ菌の浸潤調査及び清浄化に向けた取り組み

豊後大野家畜保健衛生所、大分家畜保健衛生所<sup>1)</sup>

○梅木英伸、河野宣彦、猪原明子、伊藤雅之、

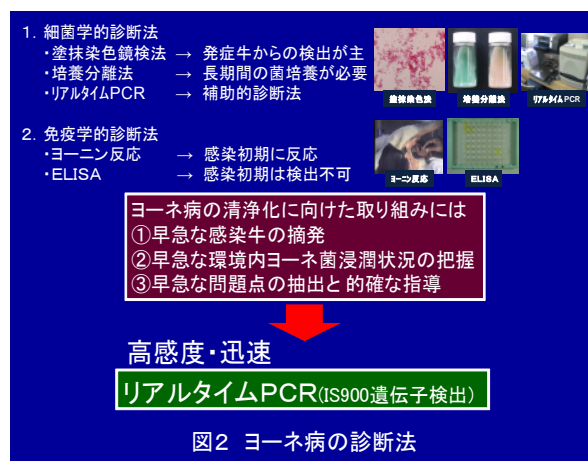
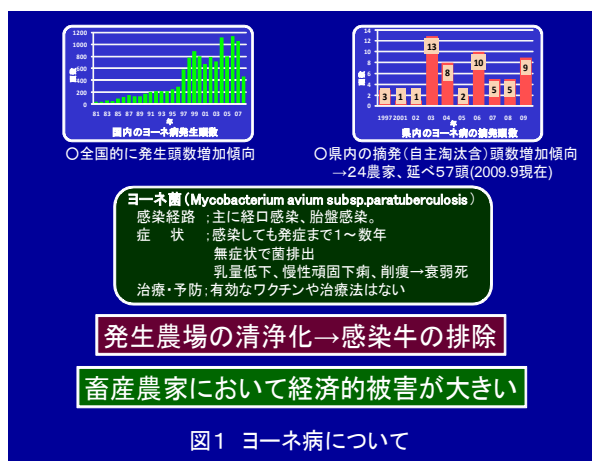
(病鑑) 滝澤亮<sup>1)</sup>、(病鑑) 山田美那子<sup>1)</sup>、(病鑑) 佐藤亘<sup>1)</sup>

### 【はじめに】

近年、ヨーネ病は全国的に摘発・淘汰される頭数は増加傾向にあり、県内においても1997年に初めての摘発以来2009年9月現在において、24農家57頭の自主淘汰を含む摘発牛を認めている。また、ヨーネ病はヨーネ菌を主に経口感染によって発生する慢性腸炎であり、感染してから発生するまでに1～数年の潜伏期間を示す。しかも、この無症状期間の感染牛は大量の菌を糞便中に排出するため、多数の同居牛にヨーネ病を伝染させる大変危険な感染源でもある。発病牛は乳量低下や慢性頑固な下痢、削瘦を呈し死に至る病気であるが、現時点において有効なワクチンや治療方法がないなどの特徴がある。そのためヨーネ病を発生した農場の清浄化には、感染牛を早急に発見し排除することが効果的な防疫手段であるが、畜産農家においては経済的に被害が大きい病気である(図1)。

ヨーネ病の診断法には細菌学的診断法と免疫学的診断法があり、国内の牛の検査で主に実施されているこれらの検査の内、塗抹染色鏡検法は主に発症牛からの検出法であること、培養分離法は長期間の培養時間が必要であること、ヨーニン反応は感染初期に反応する検査であること、ELISAは感染初期の検出が不可能な検査法であること等、これら検査法にはそれぞれの特徴がある。しかし、ヨーネ病の清浄化へ向けた取り組みには早急な感染牛の摘発、早急な環境内のヨーネ菌浸潤状況の把握、早急な問題点の抽出と的確な指導が必要であると考えられることから、上記の検査法の中で高感度で迅速な検査方法であるリアルタイムPCRが、最も清浄化への取り組みに有効と考えられる(図2)。

今回、ヨーネ病再発防止の対策を講じているが、12年間摘発牛の散見を繰り返すM農場において、リアルタイムPCRを用いて環境内のヨーネ菌浸潤状況を把握し、早急・的確な対策を講じてヨーネ病の清浄化に向けた指導を実施した。また、1例であるが分娩した感染牛とその産子を用いて胎盤感染の有無について検討を行った。

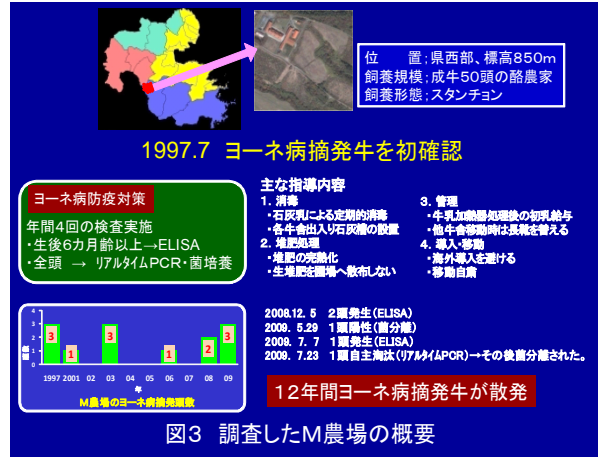


## 【M農場の概要】

ヨーネ病の浸潤調査を実施したM農場の概要は、本県の西部、標高 850m、成牛 50 頭規模の酪農家である。当農場は 1997 年 7 月にヨーネ病の摘発牛を初めて確認して、現在ヨーネ病防疫対策として、年間 4 回の検査を実施している（生後 6 カ月齢以上の牛には ELISA 検査、全頭にリアルタイム PCR と菌培養）。

また、主な指導内容として石灰乳による定期的消毒、堆肥の完熟化、加熱処理後の初乳給与、移動の自粛等の指導を実施している。

しかし、最近では 2008 年 12 月に 2 頭のヨーネ病が発生、2009 年 7 月 7 日には 1 頭発生、7 月 23 日には 1 頭の自主淘汰牛の摘発（その後菌分離）を認めたことから、当農場は 12 年間ヨーネ病の摘発牛が散発している（図 3）。



## 【材料及び方法】

農場環境内のヨーネ菌浸潤調査は、採材期間は 2009 年 7 月 21 日～11 月 16 日まで実施した。材料は、牛舎内（搾乳牛・子牛・育成・肥育牛舎、飼料調整室、バルク室、事務所の床、壁等）の滅菌生食綿花による拭い材料 43 検体、圃場の土壌 8 検体（堆肥散布圃場 5 検体、堆肥未散布圃場 3 検体）、堆肥 14 検体の計 65 検体を用いた。

野生動物へのヨーネ菌汚染調査は、主に牛舎に 93 個、圃場に 111 個の捕獲箱（シャーマントラップ）を設置してネズミを計 14 個体を捕獲した。それらネズミの腸内容物、腸管、肝臓、胎児の 33 検体を用いた。

胎盤感染調査は、2009 年 7 月 17 日に分娩して 7 月 23 日に自主淘汰したヨーネ菌に感染した母牛及び、7 月 22 日に生後 5 日目で事故死した産子を用いた。

方法は、細菌学的検査は、リアルタイム PCR を用いてヨーネ病特異遺伝子 IS900 の検出を実施した（検出サンプル→陽性、未検出サンプル→陰性）。病理学的検査は、ヘマトキシリン・エオジン染色と抗酸菌染色を実施した（表 1）。

## 【結果及び考察】

### 1. 農場環境内へのヨーネ菌浸潤調査

(1) 牛舎内へのヨーネ菌浸潤状況は、牛舎の施設図へ○または☆印を付けた場所の壁、床、餌槽、ウォーターカップ、水道水、バルククーラー、ミルクカー、オガコ、バンクリーナー、堆肥、フォークリフト・トラクターのタイヤ等 43 検体について調査した結果、☆印を付けた搾乳牛舎の床から 1 検体、堆肥舎の堆肥から 2 検体の計 3 検体から IS900 遺伝

表1 材料及び方法

1. 材料	
(1) 農場環境内へのヨーネ菌浸潤調査	
採材期間: 2009.7.21～2009.11.16(延べ65検体)	
①牛舎内(搾乳・子牛・育成・肥育・隔離牛舎、堆肥舎、飼料調整室、バルク室、事務所の床・壁等)の滅菌生食綿花による拭い → 43検体	
②圃場の土壌 → 8検体	
③堆肥舎の堆肥 → 14検体	
(2) 野生動物へのヨーネ菌汚染調査	
①2009.8.3～8.7(5日間):主に牛舎へ捕獲箱を93個設置し捕獲したネズミ1個体	
②2009.10.27～11.2(7日間):主に圃場へ捕獲箱を111個設置し捕獲したネズミ13個体	
捕獲した計14個体のネズミの腸内容物、腸管、肝臓、胎児 → 33検体	
(3) 胎盤感染調査	
①2009.7.17分娩したヨーネ菌に感染した母牛(7/23自主淘汰)	
→リアルタイムPCR陽性、その後菌分離された。	
②初乳未摂取の産子(生後5日目に事故死:7/22)	
2. 方法	
(1) 細菌学的検査	
リアルタイムPCRを用いたIS900遺伝子の検出	検出が出来たサンプル → 陽性 検出が出来ないサンプル → 陰性
(2) 病理学的検査	
① 10%中性緩衝ホルマリン固定→ヘマトキシリン・エオジン染色→鏡検	
② 10%中性緩衝ホルマリン固定→抗酸菌染色(チールネルゼン法)→鏡検	

子を検出した（図4）。

（2）圃場の土壌へのヨーネ菌浸潤状況は、○印で囲った堆肥の散布を実施している圃場から 4/5 検体、10 年以上堆肥を散布していない圃場から 1/3 検体の IS900 遺伝子を検出した（図5）。

なお、現在これらの圃場からは採草は実施していない。



図4 農場環境内へのヨーネ菌浸潤調査（牛舎内）



図5 農場環境内へのヨーネ菌浸潤調査（圃場の土壌）

## 2. 野生動物へのヨーネ菌汚染調査

野生動物へのヨーネ菌汚染調査は、○または☆印が付けた場所に牛舎へ 93 個（5 日間）、圃場へ 111 個（7 日間）の捕獲箱を設置した結果、牛舎から 1 個体（アカネズミ 1 個体）、圃場から 13 個体（アカネズミ 6 個体、ジネズミ 6 個体、ハツカネズミ 1 個体）のネズミを捕獲した。これら捕獲したズミの腸内容物、腸管、肝臓、胎児の計 33 検体について IS900 遺伝子の検出を実施したが、全ての検体から遺伝子の検出を認めなかった（図6）。



図6 野生動物へのヨーネ菌汚染調査

## 3. 検討会の開催及び指導状況

検討会の開催及び指導状況は、第1回清浄対策検討会を7月9日に開催した。この検討会では、ヨーネ菌浸潤調査への取り組みの説明、従来の指導事項の徹底、畜舎消毒・感染牛の殺処分・淘汰の計画について検討した。その後7月13日、7月23日にそれぞれ1頭殺処分・淘汰を実施、7月21日からヨーネ菌浸潤調査を開始、7月26日に畜舎の徹底消毒を実施した。第2回目の検討会を7月29日に実施した。この検討会は7月21日に実施した浸潤調査の結果から、搾乳牛舎の床、堆肥舎の堆肥、圃場の土壌からの IS900 遺伝子が検出されたことから、感染牛の存在と堆肥の濃厚感染が疑われ、堆肥の完熟化・整理

検討事項	指導及び対応内容
第1回清浄化対策検討会（7月9日）	
・ヨーネ菌浸潤調査の説明	・7/13→1頭（殺処分）
・従来の指導事項の徹底	・7/21→ヨーネ菌浸潤調査開始
・畜舎消毒の計画	・7/23→1頭（自主淘汰）
・殺処分、自主淘汰牛の計画（陽性牛）	・7/26→畜舎徹底消毒
第2回清浄化対策検討会（7月29日）	
・ヨーネ菌浸潤調査の結果説明（7/21実施分）	・堆肥の完熟化を徹底、整理・消毒
・搾乳牛舎の床、堆肥舎の堆肥、圃場土壌の汚染	・圃場への立ち入り制限、作業車の消毒
①感染牛の存在	・堆肥舎、堆肥の汚染状況調査（毎月実施）
②堆肥の濃厚感染	→農場全体のヨーネ菌浸潤状況把握が可能
→殺処分、淘汰した陽性牛の影響？	・9/17、10/16、11/16→堆肥採材
第3～5回清浄化対策検討会（9月19日、10月22日、11月26日）	
・堆肥舎の汚染状況調査の結果説明（9/17、10/16実施分）	・堆肥の切り返し回数増加の指導
	・畜舎消毒の指導

子を検出されたことから、感染牛の存在と堆肥の濃厚感染が疑われ、堆肥の完熟化・整理

・消毒、圃場の立ち入り制限等の指導を実施した。また今後、堆肥舎の堆肥についてリアルタイム PCR による検査を実施することにより、農場内のヨーネ菌動態が把握出来ると考えられ、検査を毎月 1 回実施することにした。第 3～5 回の策検討会は、堆肥の汚染状況調査結果を踏まえて、堆肥の繰り返し回数増加と畜舎消毒等の指導を実施した（表 2）、（写真 1）。



写真1 M農場の消毒作業状況

#### 4. 指導後の堆肥舎のヨーネ菌汚染調査

指導後に、毎月実施した堆肥舎のヨーネ菌汚染調査は、指導前は写真に示す様に堆肥の繰り返しをほとんど実施しておらず、堆肥は殆ど生に近い状態であり、IS900 遺伝子も 2 検体から検出された。しかし、指導後は写真に示すとおり堆肥舎が整理され、堆肥の繰り返しも十分に実施されたことから、堆肥からの遺伝子の検出は認められなくなったが、バンクリーナー直下で遺伝子が検出され、依然感染牛の存在または、牛舎内の環境にヨーネ菌が存在することが疑われた。このことから、牛舎・堆肥舎への石灰乳による消毒の実施を指導した（表 3）。

表3 指導後のヨーネ菌汚染調査(堆肥舎)

検査回数	検査年月日	バンクリーナー直下①	バンクリーナー直下②	堆肥①	堆肥②
1	2009.7.21	NT	NT	+	+
2	9.17	-	+	-	-
3	10.20	+	+	-	-
4	11.16	-	-	-	-

※ 材料の採取は各場所について6ポイントをプールし、その一部を1サンプルとした。



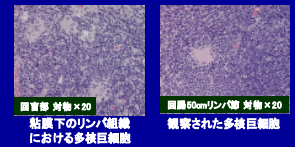
#### 5. 胎盤感染調査

胎盤感染調査は、母牛の病理学的検査結果から、回盲部、回腸 30cm のリンパ節、回腸 50cm のリンパ節から多核巨細胞が観察され、肉芽腫性の腸炎またはリンパ節炎を認めた。しかし、空腸、乳房リンパ節には著変は観察され無かった。また、検査した全ての部位から抗酸菌染色による陽性像は観察され無かった。細菌学的検査は、母牛の盲腸、回腸下部・中部から IS900 遺伝子が検出されたが、乳房リンパ節、胎盤、初乳からは遺伝子の検出を認め無かった。

表4 胎盤感染調査

- 病理学的検査(母牛・2009.7.23淘汰)
  - (1)回盲部 : 粘膜固有層にはリンパ球、好酸球が軽度浸潤、回腸ハイエル板では上皮細胞の集積、多核巨細胞が観察された。→肉芽腫性腸炎
  - (2)回腸30cm : 粘膜固有層に単核巨細胞、好酸球の浸潤を伴う粘膜絨毛の肥厚が観察された。→慢性腸炎
  - (3)回腸50cm : 粘膜固有層にリンパ球、好酸球の軽度浸潤が認められた。リンパ節 : 辺縁動脈付近に多核巨細胞が散見された。→肉芽腫性リンパ節炎
  - (4)回腸100cm : 粘膜固有層にリンパ球、好酸球の軽度浸潤が認められた。リンパ節 : 著変認めず。
  - (5)空腸 : 著変認めず。
  - (6)乳房リンパ節 : 著変認めず。
  - (7)抗酸菌染色 : 上記部位全てについて行った抗酸菌染色(チールネルゼン法)では陽性像は観察されなかった。
- 細菌学的検査
 

IS900遺伝子検出成績		
検体	母牛	子牛
盲腸	+	-
回腸下部	+	-
回腸中部	+	-
回腸上部	-	-
空腸	-	-
乳房リンパ	-	NT
胎盤	-	NT
初乳	-	NT



また、子牛からは検査した全てから遺伝子の検出を認め無かった。これらのことから、今回の症例から胎盤感染は確認出来なかった（表 4）。

#### 【まとめ】

以上のことから、リアルタイム PCR を活用することで、農場内のヨーネ菌の浸潤状

況の把握が可能であること、早急な問題点の抽出と的確な指導が可能であることが確認出来た。しかし、本報告で実施したM農場へのヨーネ病の清浄化は未だ至っていないことから、今後、リアルタイム PCR を活用した調査とヨーネ病防疫対策を併用して検査することで、汚染農場の清浄化を目指して引き続き取り組んでいきたい。

#### **【謝 辞】**

本報告を行うにあたり、多大なご指導・ご協力を賜りました NPO 法人おおいた生物多様性保全センター 足立高行理事長に深謝します。