

ヨーネ病発生農場における環境からのヨーネ菌遺伝子の検出

県央家畜保健衛生所

阿部 美樹 大屋 祥子

岩田 啓 仲澤 浩江

篠崎 隆 井澤 清

吉田 昌司

はじめに

ヨーネ病は、ヨーネ菌の経口感染によって起こる反芻獣の慢性肉芽腫性腸炎で、家畜伝染病予防法で家畜伝染病に指定されている。全国での発生頭数は、平成 24 年は 405 頭だったが、平成 25 年は 573 頭、平成 26 年は 783 頭と増加しており¹⁾、清浄化対策が求められている。また、平成 25 年 4 月よりリアルタイム PCR (rPCR) による遺伝子検査が法定検査に加わり、より迅速な診断が可能となった。県内では平成 25 年度に一酪農場において、遺伝子検査が導入されてから初めてヨーネ病患者が確認され、その後継続発生があったため、「牛のヨーネ病防疫対策要領」に基づき 3 年間に渡る清浄化対策を実施中である。当該農場の清浄化を進めるために、ヨーネ菌遺伝子の環境からの検出検査を行ったので、その概要を報告する。

概要

管内の一酪農場で、平成 25 年 9 月に 5 条検査で患畜 1 頭が摘発された。患畜の殺処分及び農場の洗浄・消毒を行ったが、翌月の患畜確認後の検査で新たに患畜 2 頭及び遺伝子検査（定性判定）陽性牛 4 頭が確認された。患畜及び定性判定陽性牛（患畜等）の淘汰後、再度農場の洗浄・消毒を行い、まん延防止のための検査を実施したところ、平成 26 年 2 月には全頭からヨーネ菌遺伝子が検出されなかった。しかし、その後のまん延防止のための検査で平成 26 年 6 月に 1 頭、平成 26 年 10 月に 2 頭の定性判定陽性牛が確認された。患畜等は摘発後すぐに淘汰し、農場の消毒も随時実施しているにもかかわらず、その後も定性判定陽性牛が散発的に摘発されたことから、農場内に他にもヨーネ菌感染牛が潜在していて徐々に排菌している可能性及び農場内がヨーネ菌に汚染されている可能性が考え

られた。このため早期に効率的な清浄化対策を進めるため、農場全体の汚染状況を把握する一助として、農場内環境中のヨーネ菌遺伝子の検出検査を試みた。

当該農場は、乳用牛 36 頭（搾乳牛 33 頭、育成牛 3 頭）を、つなぎ形式（対尻式）で飼養し、後継牛は自家産及び県外導入している。農場内には、搾乳舎及び育成舎の他、水路を挟み、広い運動場が配置されている（図 1）。なお、運動場は患畜発生後、消石灰の散布を実施し、その後 1 年間は使用を中止していた。平成 26 年 10 月に使用を再開したところ、使用した牛が定性判定陽性牛となり淘汰を実施し、以後使用を中止している。

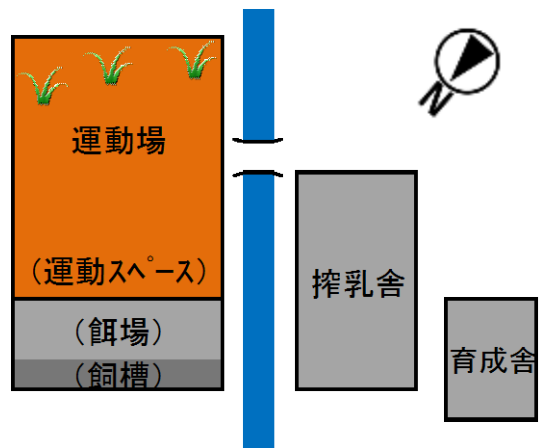


図 1 農場配置図

材料と方法

採材には、10×10cm のガーゼ、割り箸、蒸留水、50ml 遠沈管等を用いた。採材に用いる器具等は、オートクレーブ滅菌後、遺伝子を除去するために一晩 UV 照射を行った。

検体はスワブ（滅菌蒸留水で湿らせたガーゼで拭ったもの）及び土壌とした。スワブは、割り箸を用いて採材場所全体をくまなく拭うように採材し（写真 1）、採材場所の面積が広い場合は複数枚のガーゼで採材し、プール検体とした。採材は、平成 27 年 3、7、10 月の計 3 回実施し、採材場所は、運動場（運動スペース、餌場、飼槽）、搾乳舎（飼槽、通路）、育成舎（乾乳牛床、育成牛床）、から 1 回あたり 13 ヶ所を選択した（図 2）。



写真 1 採材方法

搾乳舎及び育成舎はスワブで採材し、運動場は、1 回目はコンクリートの餌場や飼槽の部分をスワブで採材し、2 回目以降は、運動スペースの土壌を採取し、餌場と飼槽はスワブで採材したものをプール検体とした（図 2 において①'、②'）。

ヨーネ菌遺伝子検出方法は、ヨーネ病検査マニュアル²⁾と同様の方法で実施し、DNA 抽出はヨーネスピピン（ファスマック）を用いたスピнкаラム法、rPCR 検査では増幅試薬に QuantiTect SYBR

Green PCR Kit (キアゲン)、プライマーに MP10-1、MP11-1 (標的遺伝子: IS900) を用いた。PCR 条件は、37°C10 分、95°C15 分反応後に 95°C30 秒及び 68°C1 分を 45 サイクル行い、Melt curve 解析を実施した。

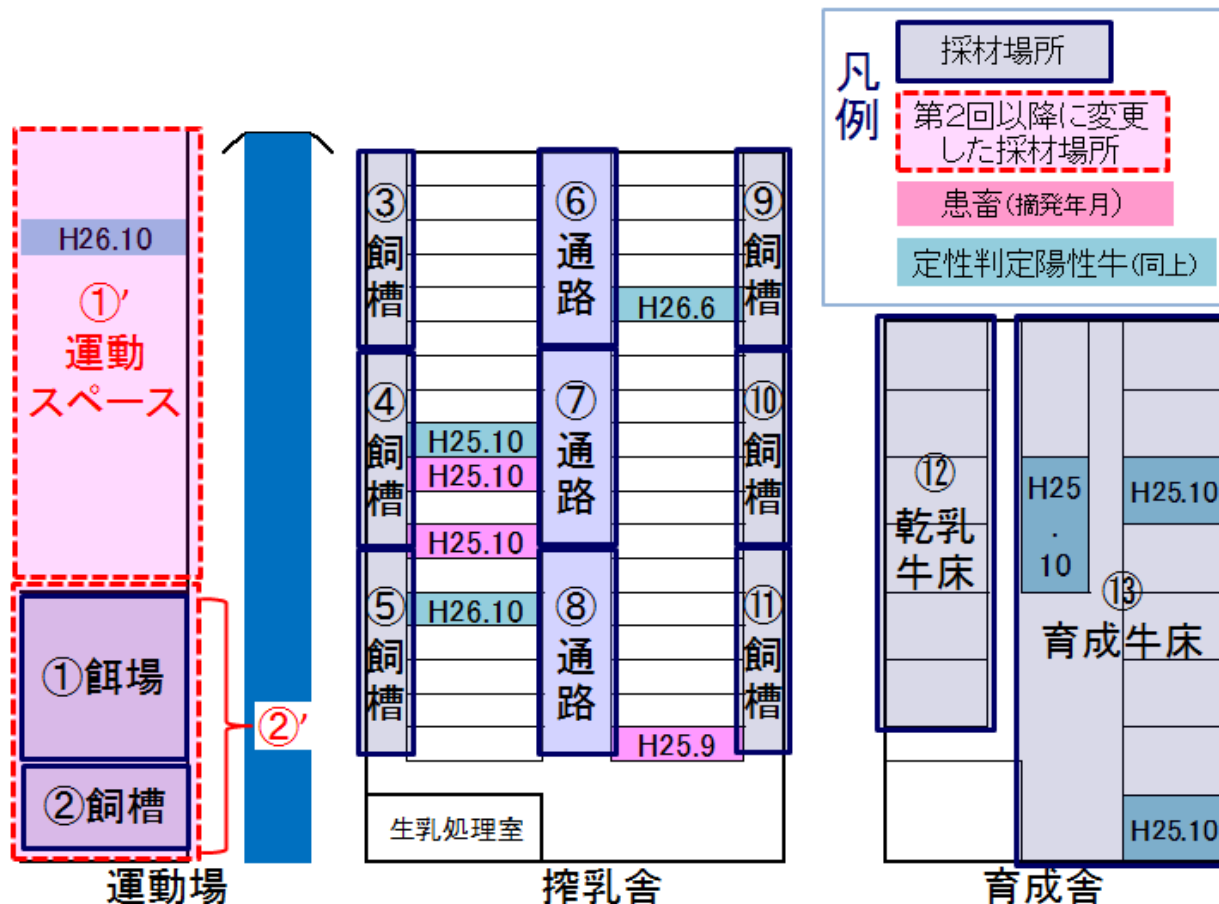


図2 採材場所

検査結果

1 1回目 (平成27年3月)

運動場の餌場及び飼槽、搾乳舎の飼槽6ヶ所及び通路3ヶ所、育成舎の乾乳牛床及び育成牛床の計13か所で検出検査を実施したところ、運動場の餌場(①餌場)と飼槽(②飼槽)の2か所からヨーネ菌遺伝子が検出された(表1)。

2 2回目 (平成27年7月)

運動場における採材場所を変更し、運動スペースの土壌及び餌場・飼槽のプール検体の2か所と

し、搾乳舎、育成舎は前回と同様の場所から採材を行ったところ、運動スペース（①' 運動スペース）及び運動場の餌場・飼槽（②' 餌場・飼槽）と、搾乳舎の飼槽2か所（⑨飼槽、⑩飼槽）の、計4か所からヨーネ菌遺伝子が検出された（表1）。

3 3回目（平成27年9月）

前回と同様の場所から採材を行ったところ、運動場の餌場・飼槽（②' 餌場・飼槽）と搾乳舎の飼槽1か所（⑨飼槽）の、計2か所からヨーネ菌遺伝子が検出された（表1）。なお、採材当日は強い雨が降っていたため運動場からは検出されなかったと考える。

表1 検出検査結果

		1回目		2回目		3回目	
		検出箇所数	遺伝子量	検出箇所数	遺伝子量	検出箇所数	遺伝子量
運動場	運動スペース	—	—	1/1 (①' 運動スペース)	0.0004	0/1	ND
	餌場	1/1 (①' 餌場)	0.0017	1/1 (②' 餌場・飼槽)	0.0028	1/1 (②' 餌場・飼槽)	0.0003
	飼槽	1/1 (②' 飼槽)	0.0001				
搾乳舎	飼槽	0/6	ND	2/6 (⑨飼槽、⑩飼槽)	0.0004 <0.0001	1/6 (飼槽⑨)	<0.0001
	通路	0/3	ND	0/3	ND	0/3	ND
育成舎	乾乳牛床	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND
	育成牛床	0/1	ND	0/1	ND	0/1	ND

※ 検出箇所数とは、「ヨーネ菌遺伝子検出箇所数/採材箇所数」を示す

※ 検出箇所数欄の下段の（）内は、検出された場所を示す

※ 遺伝子量の単位は、pg/2.5μl、ND: Not Detected

考察

環境中のヨーネ菌遺伝子の検出手法については、マニュアル等で定められたものはないが、今回試みた方法は、環境中のヨーネ菌遺伝子を検出するのに有効であると考えられ、当該農場全体の汚染状況を把握する一助となった。

平成27年3月には搾乳舎及び育成舎ともに洗浄・消毒によってヨーネ菌遺伝子は不検出となったが、運動場は運動スペースの敷地が土壌で、十分な洗浄・消毒が困難なため、ヨーネ菌遺伝子が残存していたと考えられる。その後、平成27年7、9月の検査では、搾乳舎の飼槽からヨーネ菌遺伝子

が検出されているが、これは運動場から搾乳舎にヨーネ菌遺伝子が持ち込まれた可能性があると考えられる（図3）。

本検査において、ヨーネ菌遺伝子が搾乳舎の通路、育成舎の乾乳牛床及び育成牛床から検出されなかったこと及び本検査の1か月後、平成27年10月の同居牛検査で患畜及び定性判定陽性牛が摘発されなかったことから、現時点で排菌して

いる牛が当該農場に潜在する可能性は、現在は低いと考える。

また、当該農場の運動場のような場所では、ヨーネ菌遺伝子が長期間存在と考えられる。このため、ヨーネ菌遺伝子を運動場等から牛舎内に持ち込まないための衛生管理が重要となると考えられる。今後は、運動場についての有効な消毒方法について検討していくとともに、本検査結果を活用し清浄化を目指して引き続き取り組んでいきたい。

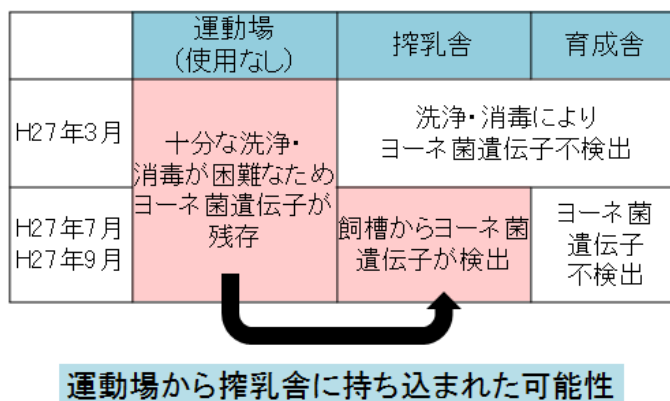


図3 考察

引用文献

- 1) 農林水産省：家畜伝染病発生累年比較（1934－2014）
http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/pdf/h26_kachiku_ruinen.pdf
- 2) 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所・細菌寄生虫研究領域
 （ヨーネ病）：ヨーネ病検査マニュアル（2011.10版、2014.10版）