

管内における牛のヨーネ病発生事例

和田山家畜保健衛生所 病性鑑定課 寺谷 知恵

【はじめに】

平成 27 年 6 月、管内 4 年ぶりに、牛のヨーネ病患者が摘発された。本事例は、患者確定検査にリアルタイム PCR（以下 rPCR）による遺伝子検査が採用されて以降、管内初の事例であった。本事例について、1 患者の精密検査、2 清掃消毒効果確認のための農場環境調査、3 分離ヨーネ菌の分子疫学的解析を実施したので、概要を報告する。

【発生概要】

家畜伝染病予防法第 5 条に基づくヨーネ病定期検査で、管内酪農家 1 戸にて 63 か月齢乳用牛 1 頭がスクリーニング検査で陽性（ELISA 値=0.8）となった。その後実施した rPCR 検査で、ヨーネ菌遺伝子量が 25.94pg/2.5μl となりヨーネ病患者として法令殺し、当所にて精密検査を実施した。患者は、軽度削瘦していたが、下痢は認められなかった（図 1）。



図 1 患者の外観

【1 患者の精密検査】

(1) 材料と方法

患者を法令殺後、解剖を実施し、病理組織学的検査及び細菌学的検査を行った。病理組織学的検査は、腸管及び付属リンパ節についてヨーネ病検査マニュアル記載部位を採材し、HE 染色およびチールネルゼン（ZN）染色を実施した（図 2-①）。細菌学的検査は、病理組織学的検査と同部位及び直腸便を用い、

rPCR とヨーネ菌分離培養を実施した（図 2-②）。

- ◆病理組織学的検査・・・①
 - ✓材料：ヨーネ病検査マニュアル記載部位を採材
 - ・空腸、回腸（回盲部上10cm、30cm、50cm、100cm）
 - ・腸管膜リンパ節（空腸、回腸）
 - ・回盲リンパ節
 - ・乳房上リンパ節
 - ✓方法：HE染色、チールネルゼン（ZN）染色
- ◆細菌学的検査・・・②
 - ✓材料：病理学的検査と同部位、直腸便（法令殺時）
 - ✓方法：(1)リアルタイムPCRによる遺伝子検査
：ヨーネスピンドNA抽出→ヨーネジーンKS
(2)ヨーネ菌分離培養（ヨーネ菌培地『共立』）

図 2 病理組織学的検査、細菌学的検査

(2) 剖検所見

空腸から回盲部にかけて、粘膜面の充血と軽度肥厚、回盲リンパ節等の腫大が認められた。また直腸便の直接塗抹および腸管粘膜のスタンプ標本を ZN 染色し、抗酸菌を確認した。

(3) 病理組織学的検査

空腸から回盲部にかけて、粘膜固有層に、類上皮細胞の増殖、ラングハンス型の多核巨細胞の出現（図 3-①）が認められ、肉芽腫病変を形成していた。そのような部位では、ZN 染色で抗酸菌が確認できた（図 3-②）。乳房上リンパ節以外のリンパ節にも同様の病変が認められた。

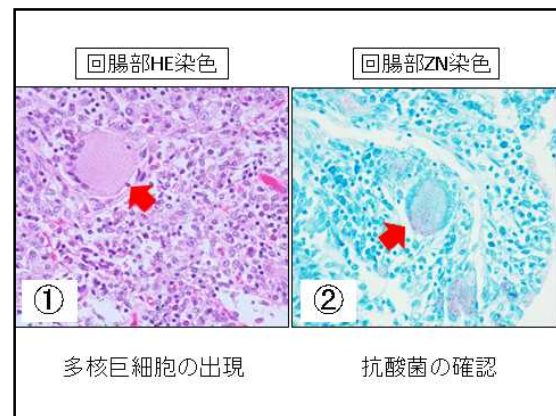


図 3 病理組織学的検査所見

(4) 細菌学的検査

ほぼすべての採材部位でヨーネ菌遺伝子が検出され、遺伝子量は、空腸部より回腸部で多く、リンパ節も同様の結果が得られた(表1)。また、細菌学的検査結果と病理組織学的検査から得た病変の程度を比較したところ、ほとんどの採材部位で病理組織学的検査による病変の程度が重度なほど、多量のヨーネ菌遺伝子が検出された(表1)。

表1 細菌学的検査結果と病変程度

部位	遺伝子量 (pg/2.5μl)	培養	病変程度
空腸	9.39×10^1	+	++
回腸①(回盲部上10cm)	1.87×10^2	+	++
回腸②(回盲部上30cm)	8.02×10^2	+	++
回腸③(回盲部上50cm)	4.61×10^2	+	++
回腸④(回盲部上100cm)	2.23×10^2	※	++
腸間膜リンパ節(空腸)	4.97×10^0	※	+
腸間膜リンパ節(回腸)	1.25×10^3	※	+++
回盲リンパ節	1.11×10^1	+	+++
乳房上リンパ節	ND	-	-
直腸便	1.72×10^1	+	NT

※ 培地が腐敗し、結果判定できず

(2) 患畜摘発直後 - 洗浄消毒後の結果

採材箇所31検体中21検体からヨーネ菌遺伝子が検出され、その遺伝子量は、患畜後ろ通路で最も多かった。洗浄消毒後も患畜牛床後ろ通路からはすべての採材部位で、患畜周辺からは飼槽側からもヨーネ菌遺伝子が検出された。また患畜ウォーターカップおよび患畜飼槽部位の2か所からヨーネ菌が分離された(図5)。

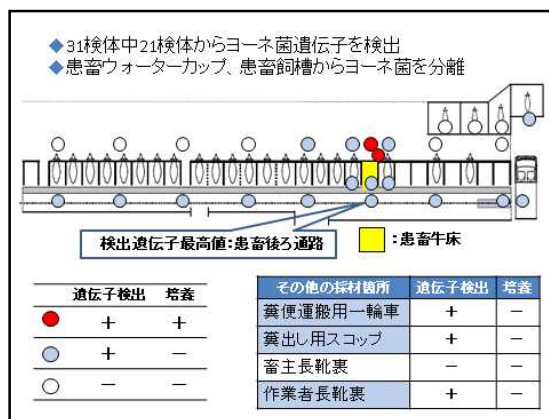


図5 患畜摘発後-消毒後の結果

【2 農場環境調査】

(1) 材料と方法

農場環境調査は、患畜摘発後実施した農場の清掃消毒効果を確認するために行った。清掃消毒を、患畜牛床及び牛床後ろ通路、子牛飼養場所を重点的に実施し、その後に環境材料を採材、rPCRによる遺伝子検査とヨーネ菌培養検査を行った。当該農場は、1列つなぎ牛舎であり、患畜牛床付近、牛床後ろ通路、飼槽側、子牛飼養場所、その他の部位、計31か所から採材した(図4)。

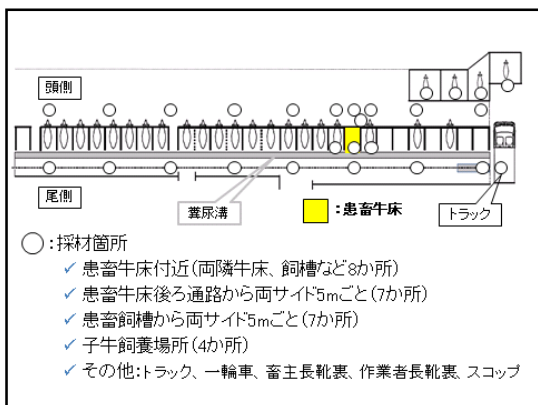


図4 農場環境調査(採材箇所)

(3) 摘発4か月後 - 消毒後の結果

10月に再度農場の清掃消毒を実施し、その後2回目の環境調査を行った。rPCRと培養検査は、前回の遺伝子検出箇所及び菌分離箇所について実施した。

その結果、21検体中6検体からヨーネ菌遺伝子が検出され、患畜右5mで最も多かったが、その遺伝子量は全ての採材箇所ですべて前回よりも減少していた(図6)。また前回の菌分離箇所からの分離は認められなかった。

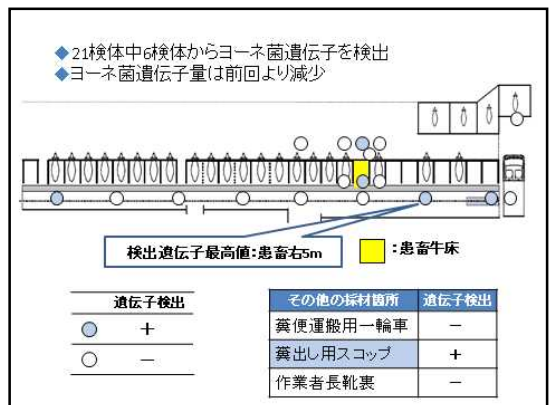


図6 摘発4か月後検査の結果

【3 分子疫学的解析】

疫学的背景を推察するため、患畜分離ヨーネ菌 1 株および環境分離ヨーネ菌 2 株の分子疫学的解析を VNTR 型別（図 7-①）と MLSSR 型別（図 7-②）で実施した。

- ◆ VNTR 型別 (Variable Numbers of Tandem Repeats)
 - ✓ ヨーネ菌等の抗酸菌の分子疫学的解析に利用
 - ✓ 牛から分離されるヨーネ菌は、Map-1～Map-17の17種類に分類でき、Map-1型とMap-2型が大半を占める …①

- ◆ MLSSR 型別 (Multilocus Short Sequence Repeats)
 - ✓ 同一VNTR型をさらに細分化でき、副次的にa型及びb型に区別できる …②

※国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所に依頼

- ◆ 材料: 患畜分離株2株(空腸、空腸腸間膜リンパ節)
環境分離株1株(患畜ウォーターカップ)

図 7 分子疫学的解析

VNTR 解析結果では、3 株すべて Map-1 型であり、患畜分離ヨーネ菌と環境分離ヨーネ菌は同一由来であることが示唆された。また MLSSR 型別により、3 株は比較的まとまった分布を示しており、VNTR 型別と同様に 3 株とも同一由来であり、Map1-a 型に区分されることが示唆された。

【考察】

患畜は重度の臨床症状を示していなかったが、精密検査より病変部が広く空腸部までおよび、また多量のヨーネ菌遺伝子検出が認められたことから、ヨーネ菌を多量に排菌していたと推察された。

2 回実施した農場環境調査より、農場内のヨーネ菌遺伝子量は減少しており、患畜以外の排菌牛はいないと考えられた。また飼槽側からのヨーネ菌遺伝子検出とヨーネ菌分離が認められており、本事例のようなつなぎ牛舎の場合、飼槽側を含めた念入りな清掃消毒が必要と思われた。

本事例で検出された Map1-a 型は、北海道由来牛にのみ検出されており、北海道の中でも本牛の生産地域にその比率が高かったという報告が認められた。本牛の疫学情報、ヨーネ菌の感染時期などを考慮すると、北海道でヨーネ菌に感染後、発生農場に導入され、患畜として摘発されたことが示唆された。

【まとめ】

rPCR が患畜確定検査に適應され、患畜の早期摘発淘汰が可能となった。初回清掃消毒後の調査で、菌分離が認められており、つなぎ牛舎の場合、飼槽側も含めた確実な清掃消毒の必要であった。分離菌の疫学解析を実施することにより、導入元の衛生状況把握やヨーネ病検査の必要性が再認識された。これまで 2 回実施した同居牛検査では、新たな患畜は認められていないが、ヨーネ病清浄化のため今後も継続的に監視していく。