

ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査を用いた効果的な農場清浄化対策

試験研究計画名：ヨーネ病発生農場におけるスクリーニング遺伝子検査法の実証

地域戦略名：牛慢性消耗性疾病の早期発見および防除技術の開発

研究代表機関名：(研) 農研機構動物衛生研究部門

地域の競争力強化に向けた技術体系開発のねらい：

牛ヨーネ病は、抗酸菌の一種であるヨーネ菌の感染による慢性消化器感染症です。ヨーネ菌に感染すると、数年にわたる潜伏期間の後に持続性の下痢、消瘦、泌乳量の低下等の臨床症状を示します。ヨーネ病の発生は畜産農家に大きな経済的損失を与えるため、国内では家畜伝染病予防法において法定伝染病に指定され、定期的な全頭検査が行われています。日本のヨーネ病汚染率は農場レベルでおよそ2%であり、欧米あるいはオセアニア諸国と比べると低い水準に抑えられています。しかしながら、ヨーネ病の発生は全国的に報告されており、なかでも北海道が8割以上を占めています(図1)。北海道は国内における主要な牛の生産地でもあるため、ヨーネ病清浄化を推進する上で重要な拠点となっています。

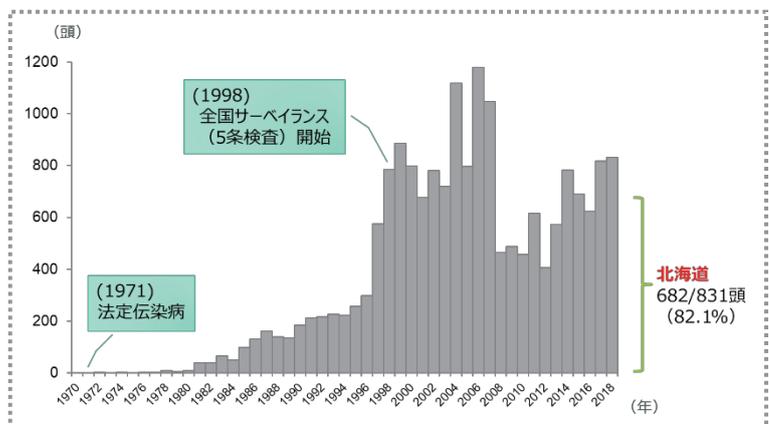


図1 国内の牛ヨーネ病発生頭数

ヨーネ病発生農場における清浄化対策は、定期的な牛群検査による感染牛の摘発淘汰を中心に進められていますが、特に大規模農場においては対策が長期化する傾向にあります。その原因のひとつとして、現行では抗体検査により感染牛をスクリーニングしていることが挙げられます。ヨーネ菌感染牛は、一般的に抗体検査で陽性になる半年~1年ほど前から糞便中に排菌している(無症状排菌期)ため、検査で摘発される前に農場内へ感染を広げてしまうことが問題となっています(図2)。そこで、ヨーネ菌感染・排菌牛を早期に摘発できる効率的な牛群検査法の導入が求められています。

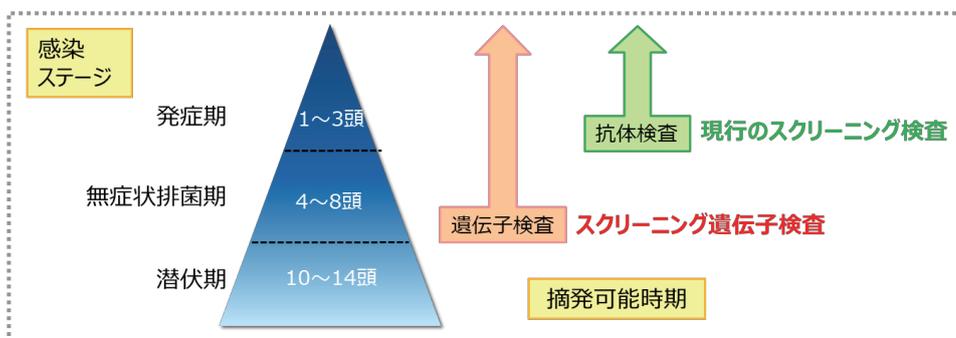


図2 ヨーネ病発生農場における牛群構成と感染牛の摘発

技術体系の紹介：

1. プール糞便によるヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法

排菌牛をできるだけ早期に摘発し、効率良くヨーネ病検査を行う手法として、「プール糞便によるヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法」を確立しました。本法は、複数の牛由来の糞便をプールすることにより検査を省力化し、遺伝子検査による牛群のスクリーニングを効率良く進めることができます(図3)。プールされた糞便は濃縮して検査されるため、個体別の検査と感度は同等であり、最大10頭分の糞便をプールすることが可能です。さらに、糞便中に含まれる様々なPCR阻害物質の影響により反応が阻害されることがあるため、検査結果が偽陰性でないことを確認するために、インターナルコントロール(IC)を用いてリアルタイムPCRを行います(図3)。陰性検体においてICの増幅が認められれば、PCR反応は阻害されていないと判断されます。

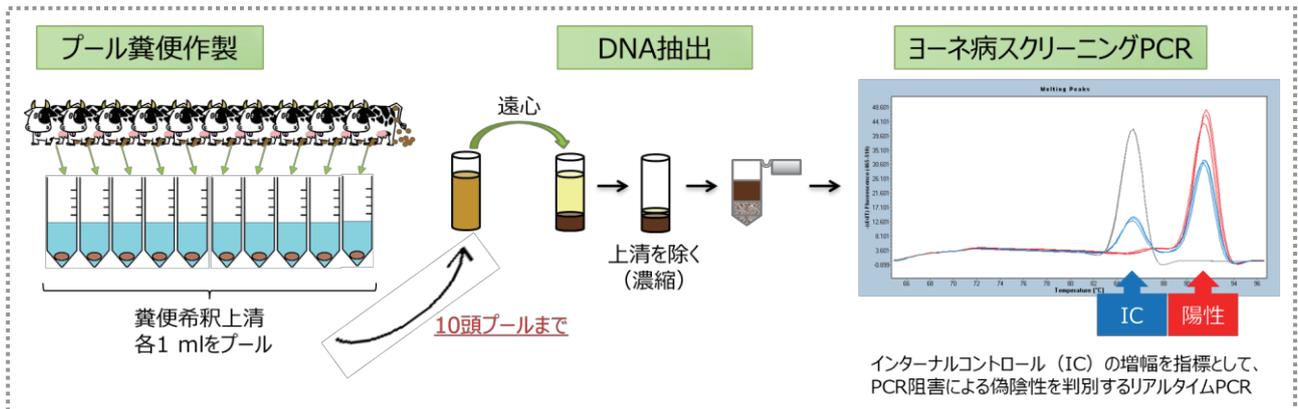


図3 プール糞便を用いたヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法概要

2. ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査実施体系

個体別に調整した糞便懸濁液の上清をプールし(1プールあたり10頭まで)、プール糞便のスクリーニング遺伝子検査を実施します(図3、4)。プール糞便の検査で陽性の場合、陽性プールに含まれる検体を個別に検査することにより、陽性個体が特定されます。最終的に個別糞便の検査で陽性と判定された個体については、状況に応じて管轄の家畜保健衛生所等においてヨーネ病診断のための確定検査を実施することになります(図4)。

なお、スクリーニング遺伝子検査において、糞便中に含まれるPCR阻害物質等の影響によりICが増幅せず、検査結果が判定できない場合(判定不能)があります。特に、プール糞便では検体が濃縮されているため、個別糞便よりもPCR反応への影響が大きいと考えられており、プール糞便検査の0.4%程度に判定不能となる検体が認められています。そのような検体については、抽出したDNAを再度精製することで残存するPCR阻害物質を除去し、再検査を行います(図4)。

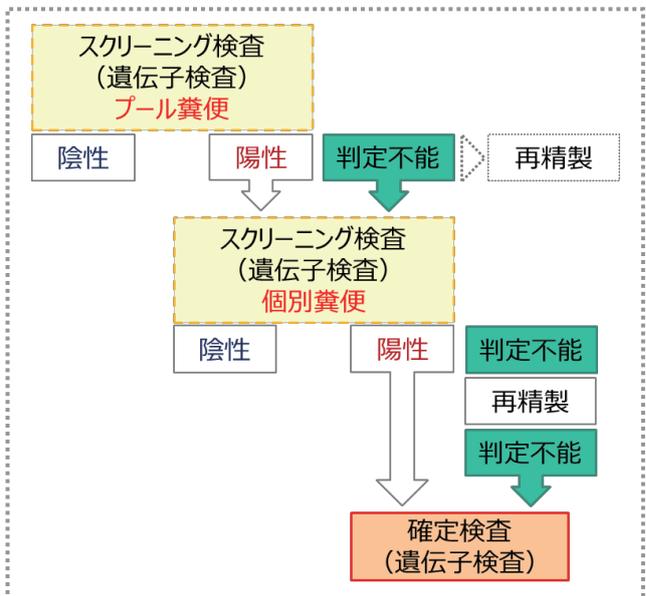


図4 スクリーニング遺伝子検査実施フロー

そのような検体については、抽出したDNAを再度精製することで残存するPCR阻害物質を除去し、再検査を行います(図4)。

3. 技術体系の特質

ヨーネ菌感染牛における糞便中への排菌は、抗体検査で陽性になる半年～1年ほど前から始まると考えられています。ヨーネ病発生農場の牛群検査にスクリーニング遺伝子検査を導入すると、抗体陰性の排菌牛も検出されるようになるため、摘発頭数は増加することが予想されます（図2）。しかしながら、感染ステージのより早い段階で感染牛を摘発することにより、農場内での感染拡大が抑えられ、より短期間でのヨーネ病清浄化が可能になると考えます（図5）。

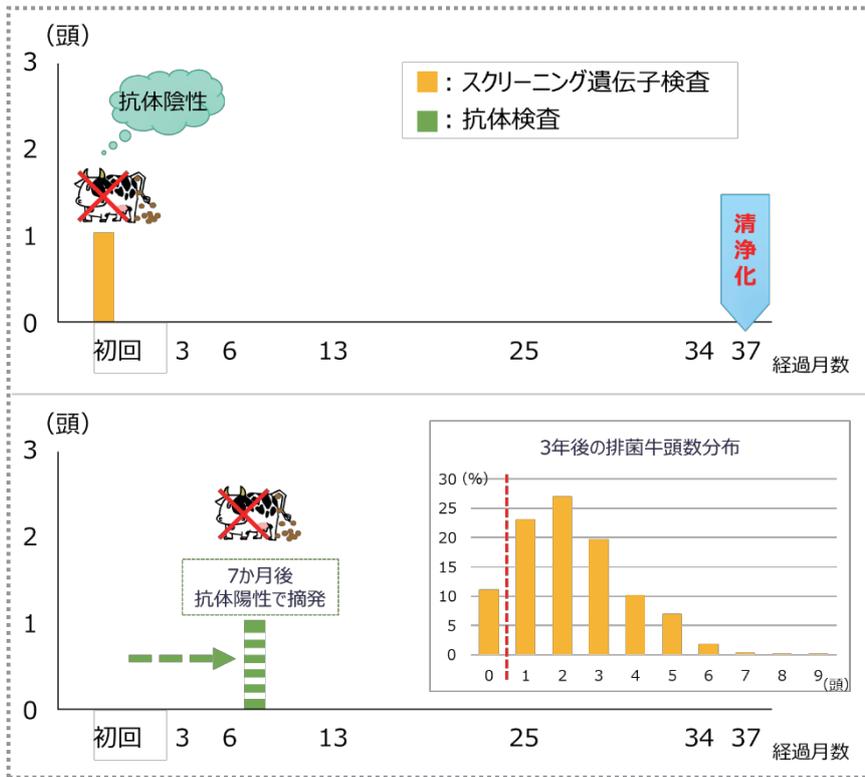


図5

【上段】

清浄化達成1農場における
検査経過：本農場では、初回の全頭検査で1頭の抗体陰性排菌牛が摘発されましたが、その後は全頭陰性となり、3年間で清浄化を達成しました。

【下段】

スクリーニング遺伝子検査未実施のシミュレーション：
上段の農場において、スクリーニング遺伝子検査を導入せず、抗体陰性排菌牛が摘発されなかった場合、高い確率で3年後も農場内に排菌牛がいることが予想されました。

さらに、複数の糞便をプールして検査を行うことにより、効率的な牛群検査が可能となり、特に、ヨーネ病清浄農場あるいは汚染度の低い農場においては検査数が減少します。例えば、図6のA農場のような清浄農場では、個体別に全頭検査を実施する場合に比べて、検査数は1/10程度になります。一方、ヨーネ病発生農場（図6-B、C、D農場）においては、プール糞便検査の陽性率が最終的な検査数に直接影響するため、D農場のような高度汚染農場では検査数の減少/省力化につながらないこともあります。また、プール糞便検査の陽性率は、農場の汚染状況の指標として捉えることもでき、陽性率の低下は清浄化が進んでいることを反映していると考えられます。

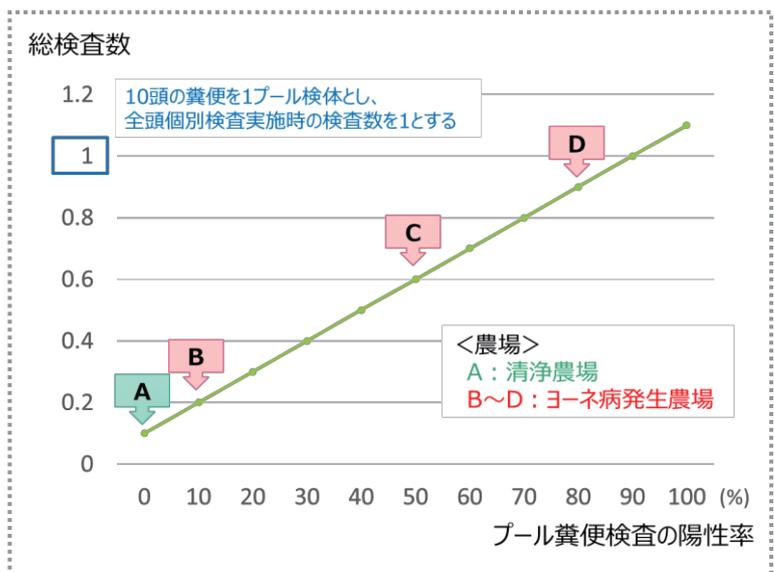


図6 プール糞便検査の陽性率と総検査数

技術体系の経済性は：

経営改善効果

ヨーネ病発生農場は、最低3年間継続して牛群の陰性が確認された場合に、清浄農場に復帰することが認められます。発生農場においては、感染牛に起因する直接的な損失（生産性の低下による損失、患者の淘汰にかかる損失等）だけでなく、牛の移動等にあたり、まん延防止のための様々な制約を受けるため、早期の清浄化が望まれます。

スクリーニング遺伝子検査を導入し、最短の対策期間（3年間）で清浄化を達成した1農場（図5上段）において、スクリーニング遺伝子検査を導入していなかった場合をシミュレーションすると、3年後には9割近い確率で農場内に排菌牛が残っていると試算されました（図5下段）。この農場では、スクリーニング遺伝子検査の導入により排菌牛が早期に摘発され、短期間で清浄化を達成することができたと考えられます。

経済的な波及効果

プール糞便を用いたスクリーニング遺伝子検査の活用により、排菌牛の早期摘発と発生農場の早期清浄化が進められると期待されます。北海道は国内における主要な牛の生産地であるため、スクリーニング遺伝子検査の導入による積極的なヨーネ病対策により、出荷牛の陰性が保証され、国内の清浄化にも寄与することが期待されます。

こんな経営、こんな地域におすすめ：

全国の家畜保健衛生所等で行われているヨーネ病検査に活用が見込まれます。具体的には、発生農場における牛群検査、非発生農場における清浄性確認のためのスクリーニング検査、さらには移動牛の陰性確認のための検査等への応用が考えられます。特に、早期清浄化を目指すヨーネ病発生農場においては、効率良く抗体陰性排菌牛を摘発できるだけでなく、農場の汚染状況を把握することで衛生対策に役立てることも可能です。

技術導入にあたっての留意点：

ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査に必要な試薬類は、研究用試薬としてすでに製品化されています。また、農研機構・動物衛生研究部門のウェブサイトにおいて、検査法のマニュアルを公開していますので、検査を実施する際には参考にしてください。

(<http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/niah/disease/paratuberculosis/index.html>)

なお、ヨーネ病は家畜伝染病予防法で規定された法定伝染病ですので、病気の診断にあたっては承認された検査法を用いる必要があります。

研究担当機関名：(研) 農研機構 動物衛生研究部門、(独) 家畜改良センター

お問い合わせは：(研) 農研機構 動物衛生研究部門 企画連携室 広報プランナー

電話 029-838-7708 FAX 029-838-7907

E-mail kouhou-niah@ml.affrc.go.jp

執筆分担 ((研) 農研機構 動物衛生研究部門 細菌・寄生虫研究領域 川治聡子)