

牛ヨーネ病発生農家の環境中ヨーネ菌汚染状況調査

上北地域県民局地域農林水産部十和田家畜保健衛生所

○ 福住 翔 東海林明子
富山美奈子 小笠原清高
白戸 明 斗沢 富夫
小笠原和弘

1 はじめに

牛ヨーネ病は、*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (以下、ヨーネ菌) の感染により半年～数年の長い潜伏期を経て、難治性の下痢および消瘦、泌乳量の低下といった症状を示す疾病である¹⁾。さらに、本病は、我が国では家畜伝染病予防法において法定伝染病として指定されており、患畜として摘発された場合、殺処分される²⁾。

管内では、現在 22 戸の牛ヨーネ病発生農家があり、そのうち約 8 割で繰り返し患畜が摘発されている。繰り返し患畜が摘発される農家では、青森県牛のヨーネ病防疫対策要領に基づく監視期間の延長や風評被害など、経済的・精神的負担は大きく、早急な清浄化が望まれる疾病である。

また、本病の起因菌であるヨーネ菌は、環境中で長期間生存することが知られており³⁾、ヨーネ菌に汚染された環境で飼養されることで、農場内での牛ヨーネ病のまん延が危惧される。

これらのことから、発生農家において、牛舎内の汚染状況を把握し、的確な洗浄・消毒を指導することが早期清浄化対策の一つと考えられる。

そこで、本調査では、発生農家の牛舎環境

中のヨーネ菌による汚染状況を把握するため、牛舎消毒前後の、ヨーネ菌リアルタイム PCR (以下、rPCR) 検査を実施した。

また、現地家保で対応可能な牛舎環境汚染の指標となる簡易的な検査方法を検討するため、同材料の直接塗抹標本を作製し、抗酸菌染色及び蛍光染色で確認できる抗酸菌と、rPCR 検査結果との相関性の有無を調べ、鏡検結果がヨーネ菌の環境汚染の指標として有効かどうかを検証した。

2 農場概要

調査対象は、繰り返し患畜が摘発されている肉用牛繁殖経営の 3 農場 (A, B, C) とした。A 農場は患畜の遺伝子量が平成 25 年以降に他の農場で摘発された患畜より高めであった農場、B 農場は 3 か月という短期間で 4 頭の患畜が摘発された農場、C 農場は平成 24 年以降 7 回再発を繰り返している農場である。なお、C 農場の初発患畜は、当所で行った病性検査で、糞便の直接塗抹標本中に、集塊状の抗酸菌が確認された事例であり、rPCR 検査による遺伝子検査導入前であったため、初発患畜の遺伝子量は不明である。(表 1)。

表 1 農場概要

農場	初発患畜		飼養頭数	累計患畜数
	決定年月日	ヨーネ菌遺伝子量 (pg/2.5μl)		
A	H25.10.01	187.50	15	2
B	H26.05.01	9.14	38	4
C	H24.09.21		32	8

※1 全て肉用牛繁殖経営農場
 ※2 C農場は糞便直接塗抹標本により集塊状の抗酸菌を確認

3 材料および方法

(1) 材料

表 2 に調査材料を示した。材料は、A, B, C 農場の牛舎環境およびトラクターを拭き取ったものとした。拭き取り対象牛舎は、患畜飼養歴がある牛舎を中心に行った。C 農場の育成牛舎は患畜飼養歴がない牛舎である。

表 2 材料

農場	対象	拭き取り箇所	計	拭き取り時期	
				1回目	2回目
A	繁殖牛舎	飼槽、水槽、床、壁、通路、柱	34	牛舎消毒前	牛舎消毒 2週間後
	育成牛舎	飼槽、水槽、床、壁			
	トラクター	運転席、バケツ			
B	繁殖牛舎1	飼槽 水槽	8	牛舎消毒前	牛舎消毒 3か月後
繁殖牛舎2					
繁殖牛舎					
C	分娩牛舎		17	牛舎消毒前	牛舎消毒 3か月後
	育成牛舎				

斜字体: 患畜飼養歴がある牛舎

拭き取り場所は、飼槽、水槽、床、壁、通路、柱、運転席、バケツ、ウォーターカップ、水飲みバケツである。

A 農場は牛舎消毒前と、消毒後 2 週間経過後に、同箇所の拭き取りを実施した。また、トラクターの消毒は行っていないため、2 回目の拭き取りは実施していない。

B, C 農場は、牛舎消毒前と、消毒後 3 か月経過後に、同箇所の拭き取りを実施した。なお、C 農場の分娩牛舎と育成牛舎の消毒後の

拭き取り検査は、消毒実施後 3 か月経過していないため、実施していない。

(2) 方法

① 拭き取り材料からの検体作製

農場の各所で、9 mL PBS 加滅菌ガーゼを用い、10 cm×10 cm の枠内を拭き取った。拭き取り後、滅菌ガーゼをストマック袋に移し、11 ml の PBS を添加した。この溶液を均質化し、ガーゼからの搾出液を検体とした。

② リアルタイム PCR (rPCR)

① で作製した検体について、市販の遺伝子抽出用キット (ファスマック社) を用い遺伝子を抽出し、ヨーネ病検査マニュアル (独立行政法人動物衛生研究所) に基づき rPCR を実施し、ヨーネ菌遺伝子量を定量した。

③ 直接塗抹標本による抗酸菌の確認

① で作製した検体のうち、2 ml をマイクロチューブに移し、5,000 回転で 5 分間遠心した。上清をデカントにより除去後、100 μl の生理食塩水を添加・混和し、20 μl をスライドガラス上の 1×1 cm の区画内に塗抹し乾燥させた。火炎固定後、常法に従い抗酸菌染色を実施した。また、蛍光染色も実施した (TB Fluorescent Stain Kit T, BD 社)。

塗抹作製後、顕微鏡にて 20 視野内の抗酸菌の有無を調べた。

4 結果

(1) 牛舎消毒前後の農場内の遺伝子量

本調査では、牛ヨーネ病患者畜として摘発される遺伝子量 (10^{-3} pg/2.5μl) を基準に、拭き取り箇所において検出された遺伝子量を振り分けした。

B, C 農場の拭き取り箇所は、A 農場の結果をもとに、牛の口が直接接触する飼槽、水槽を

対象とした。

① A農場

表3と表4は、A農場の牛舎消毒前後の遺伝子量である。消毒前は34か所中32か所で 10^{-3} pg/2.5 μ l以上の遺伝子が検出された。残りの2か所は 10^{-3} pg/2.5 μ l未満の遺伝子が検出された。(表3)。

表3 A農場：牛舎消毒前

繁殖牛舎										
壁	床	飼槽外	飼槽内	柱	通路	柱	飼槽内	飼槽外	床	壁
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

育成牛舎				
通路	水槽	飼槽	床	壁
■	■	■	■	■

トラクター	
運転席	バケツ
■	■

ヨーネ菌遺伝子量 (pg/2.5 μ l)	
■	10 ³ 以上 (32/34)
■	10 ³ 未満 (2/34)
■	非検出 (0/34)

全ての拭き取り箇所 (34/34) で遺伝子を検出
 ※マスの個数: 検体数
 ※斜線部: 拭き取り未実施

消毒後は、トラクターを除いた32か所中、飼槽や水槽を含む17か所で 10^{-3} pg/2.5 μ l未満の遺伝子が検出された。残りの15か所からは遺伝子は検出されなかった(表4)。

表4 A農場；牛舎消毒後

繁殖牛舎										
壁	床	飼槽外	飼槽内	柱	通路	柱	飼槽内	飼槽外	床	壁
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

育成牛舎				
通路	水槽	飼槽	床	壁
■	■	■	■	■

【牛舎】
 飼槽、水槽を含む17/32か所で 10^{-3} 未満の遺伝子を検出

↓

牛の口が直接触れる飼槽、水槽を対象に
 B,C農場で拭き取り検査を実施

ヨーネ菌遺伝子量 (pg/2.5 μ l)	
■	10 ³ 以上 (0/32)
■	10 ³ 未満 (17/32)
■	非検出 (15/32)

② B農場

表5は、B農場の牛舎消毒前後の遺伝子量である。

消毒前は、繁殖牛舎1の飼槽、水槽3か所から 10^{-3} pg/2.5 μ l以上の遺伝子が、水槽1か所から 10^{-3} pg/2.5 μ l未満の遺伝子が検出された。また、繁殖牛舎2では、飼槽1か所から 10^{-3} pg/2.5 μ l以上の遺伝子が検出された。

消毒後は、繁殖牛舎1の飼槽1か所のみから 10^{-3} pg/2.5 μ l以上の遺伝子が検出された。

表5 B農場

【消毒前】			
繁殖牛舎1		繁殖牛舎2	
飼槽底	水槽	飼槽底	飼槽手前
■	■	■	■

↓

【消毒後】			
飼槽底	水槽	飼槽底	飼槽手前
■	■	■	■

ヨーネ菌遺伝子量 (pg/2.5 μ l)	
■	10 ³ 以上 (4/8→1/8)
■	10 ³ 未満 (1/8→0/8)
■	非検出 (3/8→7/8)

③ C農場

表6は、A農場の牛舎消毒前後の遺伝子量である。消毒前は、繁殖牛舎の飼槽1か所から 10^{-3} pg/2.5 μ l未満の遺伝子が、分娩牛舎の飼槽1か所から 10^{-3} pg/2.5 μ l以上の遺伝子が検出された。育成牛舎からは遺伝子が検出されなかった。

消毒後は、いずれの牛舎からも遺伝子は検出されなかった。

表6 C農場

【消毒前】									
繁殖牛舎				分娩牛舎			育成牛舎		
飼槽	水槽(カップ)	飼槽	飼槽側面	飼槽	水槽(カップ)	飼槽	飼槽側面	飼槽	水飲み用バケツ
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

↓

【消毒後】									
飼槽	水槽(カップ)	飼槽	飼槽側面	飼槽	水槽(カップ)	飼槽	飼槽側面	飼槽	水飲み用バケツ
■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

※分娩・育成牛舎は今後2回目の拭き取り予定

ヨーネ菌遺伝子量 (pg/2.5 μ l)	
■	10 ³ 以上 (4/8→1/8)
■	10 ³ 未満 (1/8→0/8)
■	非検出 (3/8→7/8)

(2) 遺伝子量と鏡検結果の相関性

B, C農場の調査材料中のヨーネ菌遺伝子量と直接塗抹標本上の抗酸菌の有無を調べ、相関性が認められるか検証した。表7は、B, C農場の各拭き取り場所のrPCR結果を遺伝子量ごとに振り分け、抗酸菌染色または蛍光染色の鏡検結果と、rPCR結果が一致したもの、また、両染色による鏡検結果と、rPCR結果が一致したものに振り分けた。

遺伝子量が 10^{-3} pg/2.5 μ l以上の標本と各染色法との相関性は、抗酸菌染色では66.7%、蛍光染色では50.0%であった。両染色法で共通して認められたものは、50.0%であった。

同様に、遺伝子量が 10^{-3} pg/2.5 μ l未満の標本での相関性はいずれも50.0%であった。

遺伝子が検出されなかったものは、それぞれ、79.3%、89.7%、69.0%であった。

以上のことから、遺伝子量が 10^{-3} pg/2.5 μ l以上の場合は抗酸菌染色で、遺伝子が検出されなかった場合は蛍光染色で相関性が高い傾向が認められた。また、遺伝子量が 10^{-3} pg/2.5 μ l未満の場合は、染色法による特異性は認められなかった。

表7 遺伝子量と鏡検結果の相関性

ヨーネ菌 遺伝子量 (pg/2.5 μ l)	抗酸菌染色	蛍光染色	抗酸菌染色 ・ 蛍光染色
10^{-3} 以上	66.7% (4/6)	50.0% (3/6)	50.0% (3/6)
10^{-3} 未満	50.0% (1/2)	50.0% (1/2)	50.0% (1/2)
非検出	79.3% (23/29)	89.7% (26/29)	69.0% (20/29)

5 まとめ及び考察

本調査では、発生農家の牛舎内のヨーネ菌による環境中の汚染は広範囲に及び、牛の口が直接接触する飼槽や水槽からもヨーネ菌遺伝

子が検出された。環境中のヨーネ菌は長期間生存するという報告から³⁾、環境中に残存するヨーネ菌は、飼養牛への感染リスクとなる可能性がある。また、牛舎消毒を行うことで、ヨーネ菌による環境中の汚染は低減されるが、消毒後であっても、飼槽や水槽でヨーネ菌遺伝子が検出されることが明らかとなった。この調査を実施するまでは、牛舎消毒時に、牛が舐めることを考慮し、なるべく飼槽や水槽に消毒薬を噴霧しないようにしていたためだと考えられ、特に牛の口が直接接触する飼槽や水槽が十分に消毒されずにヨーネ菌が残存することにより、飼養牛への感染リスクが高くなることが示唆される。水槽ならばしっかり洗浄を行った後、塩素を噴霧するなど、飼槽や水槽の材質に応じ、注意して洗浄・消毒を行う必要があり、これを実践することで、飼養牛への感染リスクを低減させることが可能だと考えられる。

また、調査の結果、牛と直接接触しないトラクターからヨーネ菌遺伝子が検出されたことから、日常的な作業動線により人が牛舎内でヨーネ菌による汚染を拡大している可能性が示唆され、牛舎毎の長靴の履き替えや専用化など、飼養衛生管理基準の遵守が重要であることが再確認された。

現地家保における環境汚染指標の検査法として、ヨーネ菌遺伝子量と鏡検結果の相関性を検討したところ、ヨーネ菌遺伝子が検出された検体を用いて作製した直接塗抹標本で必ず抗酸菌が確認できるとは限らず、高い相関性は認められなかった。しかし、検体中のヨーネ菌遺伝子量が 10^{-3} pg/2.5 μ lを超えた場合は、抗酸菌染色により環境中のヨーネ菌を確認できる可能性が示唆された。このため、本

調査において、環境中の汚染指標として抗酸菌染色が有効であると考えられる。しかし、ヨーネ菌遺伝子が検出されなかった 29 検体のうち 6 検体では、直接塗抹標本で抗酸菌が確認された。これは、抗酸菌染色がヨーネ菌に特異的な染色法ではなく、ミコール酸を含む *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Gordonia*, *Tsukamurella* 及び一部の *Corynebacterium* 属も抗酸性の染色性を示すという報告とあわせると^{4, 5)}、6 検体中の抗酸菌が牛ヨーネ菌ではない可能性を示している。同様に、本調査で用いた蛍光染色キットもミコール酸を含む他の抗酸菌を染色するため、鏡検で確認できる抗酸菌がヨーネ菌であると断定するためには、他の方法を検討する必要があると考えられる。

組織切片上のヨーネ菌を同定するために抗体を用いた免疫染色法や^{6, 7)}、IS900 遺伝子を対象とした *in situ* ハイブリダイゼーション法が検討されているが⁷⁾、現地家保において対応可能なのは、ヨーネ菌の抗体を用いた免疫染色だと考えられる。抗体によっては、他の *Mycobacterium* 属と交差することが報告されているが⁸⁾、抗酸菌染色が抗酸菌以外を染色してしまうのとは異なり、抗体を用いた免疫染色であれば *Mycobacterium* 属のみを染色することが出来るため、有用な染色法であると考えられる。

また、本調査では、1 標本につき 20 視野を観察したため、検体に含まれる菌量により、鏡検で確認できなかった可能性が考えられる。このため、鏡検による菌体検出感度を向上させる手段として、検体中から効率的に集菌する方法や塗抹標本に塗布する量を検討する必要がある。

今後は、上記のことを検討しながらサンプル数を増やし、データの集積に努めたい。

(参考文献)

- 1) Manning EJ1, Collins MT., *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis., Rev Sci Tech. (2001) Apr;20(1):133-50.
- 2) 家畜伝染病予防法研究会編著; 逐条解説 家畜伝染病予防法, pp. 152, 153
- 3) Richard J. Whittington, D. Jeff Marshall, Paul J. Nicholls, Ian B. Marsh, Leslie A. Reddacliff, Survival and dormancy of *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in the environment., Appl Environ Microbiol., (2004) May;70(5):2989-3004.
- 4) Dominique J. Bress, Steven B. Reimer, Norman F. Cheville, Alisson Florance, Charles O. Thoen, Immunohistochemical detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed, paraffin-embedded bovine tissue sections., J Vet Diagn Invest. (2000) 12:60-63.
- 5) 三上 囊; ノカルジア症、放線菌症, 真菌誌, 第 48 巻, 第 4 号, pp. 186-188, 2007
- 6) Judith R. Stabel, Mark R. Ackermann, Jesse P. Goff., Comparison of polyclonal antibodies to three different preparations of *Mycobacterium paratuberculosis* in immunohistochemical diagnosis of

- Johne' s disease in cattle., J Vet
Diagn Invest. (1996) 8:469-473.
- 7) Delgado F., Etchechoury D., Gioffre A.,
Paolicchi F., Blanco Viera F.,
Comparison between two *in situ* methods
for *Mycobacterium avium* subsp.
paratuberculosis detection in tissue
samples from infected cattle.,
Veterinary Microbiology., 134 (2009)
383-387.
- 8) Wiley EL, Mulhollan TJ, Beck B,
Tyndall JA, Freeman RG, Polyclonal
antibodies raised against Bacillus
Calmette-Guerin, *Mycobacterium*
duvalli, and *Mycobacterium*
paratuberculosis used to detect
mycobacteria in tissue with the use of
immunohistochemical techniques., AM J
Clin Pathol., (1990)
Sep;94(3):307-312.