

予備的遺伝子検出法を活用した 大規模農場でのヨーネ病まん延防止対策

香川県東部家畜保健衛生所
○北所万貴子、澁市さつき

はじめに

ヨーネ病は、家畜伝染病に指定され摘発淘汰による清浄化対策が進められているが、現在も全国で年間 1,000 頭程度の発生が確認されている。本県では、家畜伝染病予防法第 5 条に基づき 4 年に 1 回の定期検査を実施している。

平成 24 年以降県内での発生はなかったが、令和 6 年 5 月、管内 1 農場 1 頭のヨーネ病患畜が確認され、県内では 12 年ぶりの発生となった。今回、発生農場でのまん延防止のための検査について、プール糞便検体を用いた予備的遺伝子検出法を選択し実施したのでその概要について報告する。

発生の概要

令和 6 年 5 月 8 日、管内大規模酪農場において 5 条定期検査のため 199 頭の採血を実施した。5 月 13 日、スクリーニング検査として ELISA をしたところ、31 頭が陽性を示したため、5 月 15 日、確定検査として 31 頭のリアルタイム PCR 検査を実施、1 頭が陽性となり、患畜と確定した。5 月 22 日、患畜の殺処分を実施し、同日に、ヨーネ病防疫対策要領「患畜確認時の検査」として同居牛 6 か月齢以上を ELISA で 76 頭、6 か月未満を PCR 検査で 50 頭、全て陰性を確認した。

発生農場は、乳用牛 275 頭・交雑種子牛 50 頭を飼養する大規模酪農場で、年間約 90 頭の乳用初任牛を県外から導入している。患畜は、令和 3 年 6 月生まれのホルスタイン種で、令和 5 年 3 月に当該農場に県外から導入され、導入時検査では ELISA で陰性を確認していた。当該牛の産歴は令和 5 年 5 月に 1 産で、臨床症状はなかった。殺処分後の解剖所見や病理組織所見はなく、ヨーネ菌分離は陰性であった。

農場消毒及び子牛出荷の対応

患畜の殺処分後、農場においては家畜伝染病予防法第 25 条に則り消毒を指導した。

発生農場から県家畜市場への交雑種子牛の出荷については、関係団体との協議により、出荷子牛の検査・陰性証明書の発行及び購買者へのアナウンスを実施すること、市場の消毒や牛の動線等を取り決め、従うこととした。

まん延防止のための検査

① 検査方法の検討

対策要領における「まん延防止のための検査」については、令和6年4月の要領改正（図1）を考慮し、検査法を検討した。

当該農場での、これまでの定期検査結果によると令和2年は、ELISAで132頭中7頭が陽性となりPCR検査をしたところ陽性は0頭、令和6年は、ELISAで199頭中31頭が陽性、そのうちPCR検査で陽性となり患畜となったのは1頭であり、この農場では、ELISA検査で非特異反応が出ることが多いと考えられた。

また、発生農場での感染牛の早期発見により感染拡大を防ぎ、早期清浄化を図るため、より検出感度が高く、さらに、多検体に対応するプール糞便検査が可能であることを考慮し、予備的遺伝子検出法のうちヨーネファインドを採用した（図2）。

	改正後		改正前	
	6か月齢以上	6か月未満	6か月齢以上	6か月未満
スクリーニング検査	抗体検査 (ELISA) または 予備的遺伝子検査 （ヨーネファインド（プール糞便○） ヨーネジーンKS（プール糞便×））	抗原検査 （細菌検査または遺伝子検査） または ヨーニン検査	抗体検査 (ELISA)	ヨーニン検査
確定検査	細菌検査 または 診断的遺伝子検査 （ヨーネファインドプロ）		細菌検査 または 遺伝子検査 （ヨーネジーンKS）	

図1. ヨーネ病防疫対策要領の改正
家畜伝染病予防法施行規則別表の一部改正
（令和6年4月1日施行）

当該農場の定期検査結果 令和2年定期検査 スクリーニング (ELISA) 7頭 / 132頭 陽性 確定検査 (PCR) 0頭 / 7頭 陽性 令和6年定期検査 スクリーニング (ELISA) 31頭 / 199頭 陽性 確定検査 (PCR) 1頭 / 31頭 陽性 非特異反応が多い	患畜確認後 ・感染牛の早期発見 ・早期清浄化 ↓ ・より検出感度が高い ・プール糞便検査により 多検体処理が可能 上記を満たす検査法
予備的遺伝子検出法を採用 （ヨーネファインド）	

図2. 検査方法の検討

② 検査計画

患畜確認時の検査以降、およそ3カ月毎に全頭検査を3回実施する。1回につき約300頭の検査となり、当所のみでは人員が不足するため関係機関や管轄外家保に協力を依頼し、作業行程を計画した（図3）。農場での糞便採材と検体作製、核酸抽出までを1日100頭、3日間で行い、4日目にPCR検査を実施する。また、市場出荷子牛の検査を月に1～2回、導入牛検査を随時、全て、糞便を採材しプール糞便を用いた遺伝子検査を実施することとした。

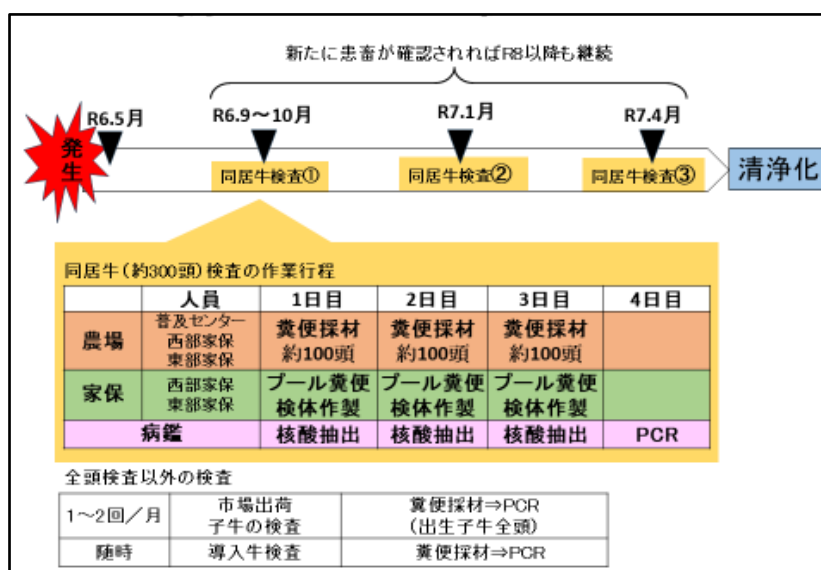


図 3. まん延防止のための検査計画

採材及び検体作製の方法

①農場での糞便採材

糞便採材は、検体の汚染を防ぐことに注意を払い、以下のように実施した。

採材係が直検手袋を使用して牛の直腸便を採取、検体処理係がスプーンで糞便を適当量採り、50ml 遠沈管に入れる（図 4，図 5）。台帳係が牛の番号と遠沈管の番号を確認し、台帳に記入する。



図 4



図 5

②検体作製

プール糞便検体の作製は、ヨーネ病検査マニュアルに従い次のように実施した。糞便 1g を量りとり、滅菌蒸留水 20ml で希釈後激しく混合攪拌、30 分静置する。静置した懸濁液上清のできるだけ上層部から 1.0ml を採取し、15ml 遠沈管へ最大 10 検体分をプールする。

結果

①検査頭数及び検査結果

「まん延防止のための検査」を、現在までに2回実施した（R6.3月末現在）。1回目は4日間の日程で295頭、2回目も4日間の日程で310頭の検査をし、全頭の陰性を確認した。また、市場出荷子牛208頭、導入牛48頭についても、遺伝子検査を実施し、全頭陰性を確認した（表1）。

表1. 検査結果

	1回目 (9/30～10/3)	2回目 (1/14～1/17)	結果
成牛	279	288	全頭陰性
子牛	16	22	全頭陰性
合計	295	310	全頭陰性
市場出荷子牛(R6.5～R7.1)	208	全頭陰性	
導入牛(R6.7～R6.12)	48	全頭陰性	

②検査時間の比較

2回実施した全頭検査の、全行程にかかった時間を表2の①に示した。表2の②には、同検査を、ELISAで実施した場合にかかると考えられる時間の試算を示した。①の予備的遺伝子検査が②のELISA検査より、約3.2倍、時間を要する。

表2. 検査にかかる時間

①予備的遺伝子検出法(ヨーネファインド) (分)			
項目	1回目 (9/30～10/3)	2回目 (1/14～1/17)	合計
糞便採材	270	250	520
プール糞便検体 作製	糞便1g計測 240	250	490
	検体処理 465	530	995
核酸抽出	360	360	720
PCR	150	150	300
合計	1,485	1,540	3,025①
②抗体検査(ヨーネライザ・スクリーニングKS) (これまでの実績から試算) (分)			
項目	1回目	2回目	合計
採血	180	180	360
検体処理	120	120	240
ELISA	180	180	360
合計	480	480	960②
①は②の約 <u>3.2倍</u>			

③人員比較

必要な人員についても、同様に比較した（表 3）。①の方が②の約 4.2 倍の人員を要する。

表 3. 検査に要する人員

①予備的遺伝子検出法(ヨーネファインド)にかかる人員 (名)			
項目	1回目 (9/30~10/3)	2回目 (1/14~1/17)	合計
糞便採材	24	32	56
プール糞便検体作製	14	21	35
核酸抽出・PCR	1	1	2
合計	39	54	93①
②抗体検査(ヨーネライザ・スクリーニングKS)にかかる人員 (名) (これまでの実績より試算)			
項目	1回目	2回目	合計
採血	7	7	14
検体処理	2	2	4
検査	2	2	4
合計	11	11	22②
①は②の約4.2倍			

④検査費用比較

検査にかかる費用についても同様に比較した（表 4）。内訳は表のとおりで、①は②の 4.2 倍の費用がかかる。

表 4. 検査費用

①予備的遺伝子検出法(ヨーネファインド・プール検査)	
必要資材	円/頭
消耗品	941.6
動製剤	123.4
検査薬	979
合計	2,044①
②抗体検査(ヨーネライザ・スクリーニングKS)	
必要資材	円/頭
消耗品	232.1
動製剤	260.2
検査薬	0.1
合計	492.4②
①は②の4.2倍	

まとめ

県内で12年ぶりにヨーネ病が発生し、発生農場のまん延防止のための検査に、プール糞便検体を用いた予備的遺伝子検出法を採用した。現在までに、2回の検査を実施し、全頭の陰性を確認した。検査に要した時間、人員、費用を、抗体検査を実施した場合の試算と比較したところ、時間は3.2倍、人員4.2倍、費用は4.2倍必要であることが分かった。

ヨーネ病防疫対策要領の改正によりスクリーニング検査に選択肢が増え、農場や、検査対象となる牛の状況に合わせて検査法を選択することが可能となった。一方で、多頭数の遺伝子検査を実施するには、農場での採材から検体作製・PCR検査までの時間・人員・予算の確保が困難であり、今後の課題であると考えられた。