

ヨーネ病検査結果分析から疑われた抗体非特異反応の一考察

西部家畜保健衛生所

○三好里美・光野貴文

はじめに

ヨーネ病は最も発生の多い法定伝染病であり、毎年増加傾向にある。そこで、国は平成18年11月に全国的な対策をするため、ヨーネ病防疫対策要領を制定し、発生農家では年4回、全頭の抗体検査と細菌検査を規定し、本県でも平成19年度から運用を開始した。

しかし、平成19年10月、福島県と神奈川県において、疑似患畜と判定された後、検査材料採材時に遡って牛乳が自主回収されたことからエライザ法及び検査に3ヶ月以上かかる細菌分離の実施が困難となった。そこで、国は平成20年7月に予備的抗体検出法としてスクリーニング法を、また、平成20年9月に要領中の細菌検査の代替としてリアルタイムPCR法が規定された。その後、当管内で実施してきた法5条に基づくヨーネ病検査結果、さらに発生のあった2戸で要領に基づくまん延防止対策を実施した結果を分析するとともに、その結果から抗体検査の非特異が疑われる事例に遭遇したのでその概要を報告する。

ヨーネ病検査概要

当管内では法5条に基づく検査で平成20年4月から平成22年12月までに搾乳牛18戸810頭について検査した。その間、発生のあった2戸延964頭について要領に基づくまん延防止対策を実施した。

発生2農場の概要

A農場は110頭（搾乳80頭）を飼養するフリーバーン式農場で多くは自家産であるが一部北海道から導入している。ヨーネ病の初発は、平成20年11月に抗体検査で1頭を摘発した。なお、患畜に症状や病理所見は無く、ヨーネ菌分離も陰性であった。

B農場は、45頭（搾乳38頭）を飼養するフリーバーン式農場で全て自家産であった。ヨーネ病の初発は平成21年6月に抗体検査で1頭を摘発した。なお、患畜に症状や病理所見は無く、ヨーネ菌分離も陰性であった。

材料及び方法

非発生農場16戸650頭、発生農場2戸延964頭についてスクリーニング法（プルキエ、京都微生物化学研究所）及びエライザ法（ヨーネライザⅡ、共立製薬）による抗体検査の結果を分析した。また、発生農場の6ヶ月以上の全ての牛を対象に3ヶ月おきに糞便由来ヨーネ菌遺伝子について、リアルタイムPCR法（ヨーネ病検査マニュアル記載）を実施した。

抗体非特異反応の抗酸菌の関与について調査するため、スクリーニング法3回以上陽性牛A農場6頭、B農場12頭の糞便18検体と発生農場の敷料A農場6検体、B農場7検体の計13検体について、ヨーネ菌用培地（共立製薬）を用い37℃4ヶ月培養した。また、乳房炎の関連を調査するため、A農場の牛群検定の乳体細胞数を用いた。

1. ヨーネ病抗体検査結果の分析

1) スクリーニング法検査結果

スクリーニング法（S法、プルキエ）の検査結果を表1に示した。ヨーネ病非発生農場16戸650頭の平均S/P値は8.2。陽性頭数は9頭1.4%であった。一方、発生A農場は延783頭の平均S/P値が17.8、陽性頭数61頭、7.8%と有意に高かった。

B農場は181頭の平均S/P値は40.9、陽性頭数52頭、28.7%とさらに高かった。しかし、エライザ法（E法、ヨーネライザII）でも陽性で患畜になったのは、A農場は初発の1頭を含む4頭、B農場は初発の1頭のみであった。

2) スクリーニング法S/P値とエライザ法エライザ値の相関

非発生農場のスクリーニング法陽性牛のS/P値とエライザ法エライザ値に相関はなかった（図1）。

一方、発生農場は、相関があったが、相関係数は0.557と低かった（図1）。

2. 発生農場におけるまん延防止対策

A農場のまん延防止対策の結果を表2に示した。スクリーニング法では高率に陽性となったが、その後のエライザ法でも陽性で患畜となったのは3頭のみであった。また、7回にわたり計783頭の糞便からヨーネ菌遺伝子は検出されなかった。また、患畜となった3頭も症状、病変もない無病巣牛で菌分離も陰性であった。

表 1. S法検査結果の比較

	検査頭数	S法 平均S/P値	S法陽性		E法2回陽性 (患畜頭数)	
			頭数	%		
非発生農場 (16戸)	650	8.2 ^a	9 ^a	1.4	0	
発生農場	A農場	783	17.8 ^b	61 ^b	7.8	4
	B農場	181	40.9 ^b	52 ^b	28.7	1

(ab間p<0.01、cd間p<0.01)

図 1. S法S/P値とE法E値の相関

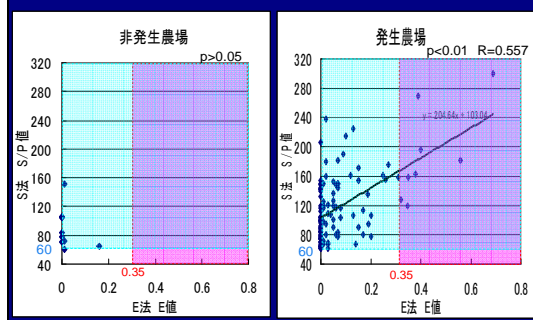


表 2. A農場のまん延防止対策

年月	検査頭数	S法 陽性頭数 (%)	E法2回陽性 (患畜頭数)	細菌検査 (rPCR)
20.12	111	5 (4.5)	0	0
21.4	115	7 (6.1)	0	0
21.7	113	13 (11.5)	0	0
21.10	110	15 (13.6)	3	0
22.2	110	8 (7.3)	0	0
22.5	111	9 (8.1)	0	0
22.9	113	4 (3.5)	0	0
合計	783	61 (7.8)	0	0

※患畜3頭 症状・病理所見・ヨーネ菌分離 陰性

同じくB農場もスクリーニング法では高率に陽性となったが、初発の1頭以外はエライザ法で陰性となった(表3)。また、4回にわたり計181頭の糞便からヨーネ菌遺伝子は検出されなかった(表3)。

以上の結果、A農場、B農場ともに患畜をはじめ、複数回の同居牛全頭検査の結果、ヨーネ菌が一度も検出できないことからA農場、B農場における抗体陽性は非特異反応の可能性が高いと考えられた。

また、個体別には、陽性回数で分類したところ、3回以上陽性となった牛がA農場は約半数、B農場は約7割を占め、毎回、同じ牛が陽性となる傾向が見られたことから、A農場、B農場における非特異反応に何らの要因の存在が伺えた(図2)。

3. 中四国各県のヨーネ病防疫対策

中四国各県にアンケートした結果を表4に示した。中四国各県で合計75,216頭を検査した結果、スクリーニング法陽性は1,532頭、2.0%。そのうち、患畜となった牛はわずか72頭、4.7%だった。また、患畜72頭のヨーネ菌分離検査で、分離されたのはわずか4頭だった。さらに、発生農場における4,940頭の糞便のリアルタイムPCR検査で陽性となったのはわずか8頭だった。以上より、ヨーネ菌が1度も検出できない発生農場が、54戸中47戸、87%と他県においても多くの発生農場が当管内と同様の結果であった。

4. 抗体非特異反応への関連要因

1) 抗酸菌

抗体非特異反応への関与が報告されている¹⁾²⁾抗酸菌についてスクリーニング法で3回以上陽性となっている牛18頭の糞便からの抗酸菌分離を試みた結果、抗酸菌が分離されたのは、B農場の1頭のみで

表3. B農場のまん延防止対策

年月	検査頭数	S法 陽性頭数(%)	E法2回陽性 (患畜頭数)	細菌検査 (rPCR)
21.6	47	10 (21.3)	1	0
21.11	45	13 (28.9)	0	0
22.3	47	15 (31.9)	0	0
22.6	42	14 (33.3)	0	0
合計	181	52 (28.7)	0	0

図2. S法陽性回数別頭数

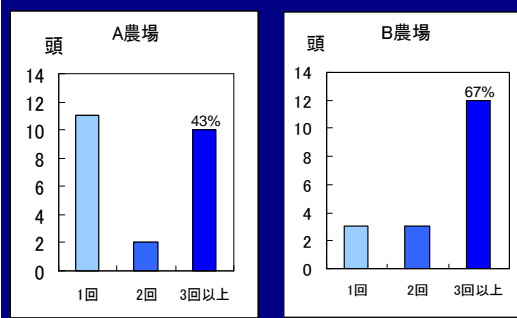


表4. 中四国各県のヨーネ病防疫対策
(アンケート結果:集計期間20年7月~22年10月)

	中四国		香川県
	S法陽性頭数 (%)	1,532/75,216 (2.0)	200/4,978 (4.0)
うち患畜 (%)	72/1,532 (4.7)	18/200 (9.0)	
菌分離陽性頭数/患畜 (%)	4/72 (5.6)	2/18 (11.1)	
細菌検査(rPCR)陽性頭数 (%)	8/4,940 (0.2)	4/2,312 (0.2)	
ヨーネ菌未検出発生農場数 (%)	47/54 (87.0)	8/10 (80.0)	

表5. 抗酸菌分離結果

S法3回以上陽性牛の抗酸菌分離結果

農場	検査数	抗酸菌分離	16S rRNA同定
A	6	0	
B	12	1	Mycobacterium paraffinicum or Mycobacterium scrofulaceum
敷料			
農場	検査数	抗酸菌分離	16S rRNA同定
A	6	1	Mycobacterium nonchromogenicum or Mycobacterium arupense
		2	Mycobacterium thermoresistibile
B	7	2	Mycobacterium thermoresistibile

あった。また、A農場、B農場の敷料 13 検体からは、5 検体から 2 種の上記とは別の抗酸菌が分離された（表 5）。

2) 乳房炎との関連

同様に報告されている¹⁾乳房炎との関与について検討した。図 3 は抗体検査実施月において、体細胞が 283 千/ml（牛群検定の高体細胞の基準）より低い牛と高い牛の頭数を表し、そのうちスクリーニング法陽性頭数をピンク色で表示している。当農場では平成 21 年 7 月と 10 月に乳房炎が多発し、体細胞の高い牛が増加したが、それと同時にスクリーニング法陽性牛も有意に増加した（ χ^2 乗検定）ことから、関連性あると考えられた（表 6）。

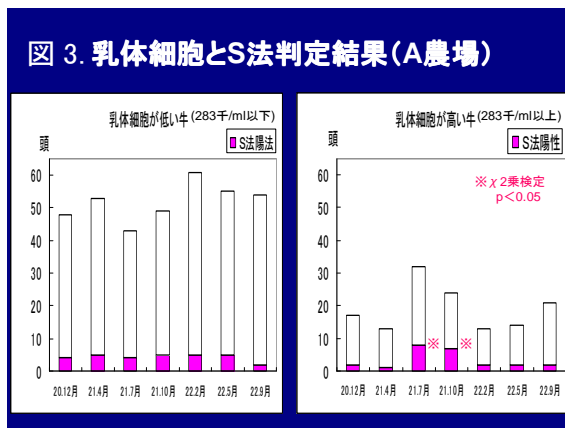


表 6. 2 × 2 分割表

	21年7月		頭数
	体細胞高い	体細胞低い	計
S法陽性	8	4	12
S法陰性	14	35	49
計	22	39	61

p<0.05

	21年10月		頭数
	体細胞高い	体細胞低い	計
S法陽性	7	5	12
S法陰性	12	41	53
計	19	46	65

p<0.05

まとめ及び考察

ヨーネ病抗体検査において、新たにスクリーニング法が導入されて以降の当管内の検査結果及びその間に発生があった 2 農場でまん延防止対策を行った結果をとりまとめた。スクリーニング法は、非発生農場においても 1.4%と陽性率が高かったが、それにも増して発生 2 農場では、7.8%、28.7%と陽性率が有意に高かった。また、スクリーニング法 S/P 値とエライザ法エライザ値との相関係数は 0.918 と動物衛生研究所は報告している²⁾が、当管内の発生農場における相関係数は 0.557 と低く、非発生農場では相関関係も認められなかった。また、スクリーニング法とエライザ法の特異性は 99.7%と 100%と動物衛生研究所は報告している³⁾が、発生 2 農場では、抗体検査では陽性となるものの、患畜をはじめ複数回の同居牛全頭検査でヨーネ菌が一度も検出できないことから 2 農場における抗体陽性は非特異反応の可能性が高いと考えられた。また、毎回同じ牛が陽性となる傾向も認められ、この 2 農場に存在する特定の要因により抗体非特異反応がおこっていると推測された。

特定の要因を調査するため、非特異反応への関与が報告されている抗酸菌¹⁾²⁾と乳房炎¹⁾について検討した。抗酸菌は、スクリーニング法で 3 回以上陽性となった牛 18 頭の糞便か

ら抗酸菌分離を試みた結果、分離されたのは1頭のみ、また、発生農場の敷料13検体からは5検体2種の別の抗酸菌が分離されたが、糞便からの分離率が低く、分離された抗酸菌との共通性も見られなかったため、当該農場に抗体非特異反応への抗酸菌の関連は不明である。また、畜主がスクリーニング法陽性牛に乳房炎牛が多いと感じていたため、統計的検証を試みたところ、乳房炎多発時期において、体細胞が高い牛がスクリーニング法で有意に陽性になっていることがわかり、乳房炎は間接的影響も含め、抗体非特異反応に何らかの関連があると示唆された。

平成20年からスクリーニング法が導入されたが、日本での検査成績や特異性・感度に関する情報が少ないことから、早急な評価が求められている。今後、全国的に検査成績を収集し、特にスクリーニング法の特異性については、再確認する必要があると思われる。

また、エライザ法も含め、抗体検査の非特異性が強く疑われる農場では、抗体検査で評価せず、リアルタイムPCRなどの細菌検査で清浄化を確認するなどヨーネ病防疫対策要領の再検討をする必要があると思われる。

引用文献

- 1) 濱崎尚樹(2009)：ヨーネ病抗体非特異反応が疑われた農場における防疫対応 平成21年度新潟県家畜保健衛生業績発表会
- 2) 動物衛生研究所 ヨーネ病研究チーム(2008)：牛ヨーネ病の血清学的診断における非特異反応の解析 「平成20年度人畜共通感染症等危機管理体制整備調査等委託事業」成果報告書 11-12
- 3) 動物衛生研究所 ヨーネ病研究チーム(2008)：「平成20年度人畜共通感染症等危機管理体制整備調査等委託事業」成果報告書 37-38