

原著

環境材料を用いた農場レベルの ヨーネ病スクリーニング検査

榊原伸一[†] 菅野 宏 立花 智

北海道十勝家畜保健衛生所（〒089-1182 帯広市川西町基線59-6）

（2016年10月28日受付・2017年5月10日受理）

要 約

環境材料を用いたヨーネ菌検査（環境検査）が、農場レベルのヨーネ病スクリーニング検査として有用か検証した。29農場で感染牛の摘発時に環境検査を実施した。各農場の環境検査結果と感染牛の糞便1g中のヨーネ菌生菌数（排菌量）の関係をロジスティック帰帰モデルで評価した。環境検査の陽性確率は感染牛の排菌量が多い農場ほど高く、同確率が90%となる排菌量は 7.8×10^1 CFU/gであった。環境検査は排菌量の低度な牛が在籍する農場を摘発可能で、省力的であることから、環境検査を頻回実施することで国内のヨーネ病防疫の進展に寄与できると考えられた。

——キーワード：環境検査，ヨーネ病，スクリーニング検査，排菌量，農場内伝播。

-----日獣会誌 70, 511～515 (2017)

ヨーネ病 (JD) は *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (ヨーネ菌) を原因菌とする反芻動物の慢性腸管感染症で、発症牛は持続的な下痢症を呈して死亡し、発症前の感染牛も腸管での栄養吸収不全を要因とする泌乳量や繁殖成績の低下を示す [1, 2]。ヨーネ菌は糞便中に排泄され、排菌量は病態の進行に伴い増加し、特に発症期には大幅に増大する [1, 3-5]。JDのおもな感染経路は経口感染である。発症牛等によって高度に汚染された環境で飼養された牛は特にヨーネ菌を摂取しやすく、JDに感染しやすいとされる [4]。

日本国内では、JDは撲滅対象疾病とされ、特に1998年以降は家畜伝染病予防法に基づく摘発・淘汰が実施されている。2歳齢以上の牛は少なくとも5年ごとの検査（定期検査）が義務づけられ、血清のELISA [6] によるスクリーニング検査と、ELISA陽性牛のリアルタイムPCR (qPCR) [7] による確定検査が実施されている。JD汚染農場では感染牛の最終摘発・淘汰後1年間に3回、その後の2年間に2回の計5回、定期検査と同様のELISAとqPCRによる検査に加えて糞便の培養検査 [6] による6カ月齢以上の牛を対象とする検査（同居牛検査）が実施されている。このサーベイランスの結果、諸外国に比べて農場のJD陽性率は低いとされるが、2014年

現在でも年間784頭の感染牛が摘発されており [8]、効率的に撲滅を進めるには防疫対策の改善が求められる。

現在の防疫対策における問題点の一つに、定期検査間隔の長さが挙げられる。JDの発症ピークは3～5歳齢とされるため [1]、定期検査の間隔に感染牛が発症することは十分に考えられる。そうなれば環境が高度に汚染され、JDの伝播が発生し得る。効率的に撲滅を進めるには定期検査の頻回実施が必要になるが、特に検査人員に限界がある現状では、より省力的な検査方法が求められる。

省力的な農場レベルのスクリーニング検査方法としては、ドイツ、アメリカやカナダにおいて農場環境材料を用いたヨーネ菌検査（環境検査）が報告されている [9-11]。しかし、汚染度の低い国内において環境検査が十分な検出力をもつか不明である。そこで本調査では、環境検査の結果と感染牛の排菌量、農場の飼養形態や規模等の関連を評価することで、環境検査が国内でのJDサーベイランスに有用か検証した。

材料及び方法

環境検査実施農場：北海道十勝管内において2015年

[†] 連絡責任者：榊原伸一（北海道十勝家畜保健衛生所）

〒089-1182 帯広市川西町基線59-6

☎ 0155-59-2021 FAX 0155-59-2571

E-mail : sakakibara.shinichi@pref.hokkaido.lg.jp

5月～翌年6月に定期または同居牛検査で感染牛が摘発された農場のうち、同意を得られた延べ29農場で感染牛摘発時に環境検査を実施した。うち、飼養形態別では酪農場17戸及び肉用素牛生産農場（肉素農場）12戸で、飼養頭数は23～1,420頭であった（表1）。

採材箇所と方法：採材は採材適所と報告されている堆肥舎床 [10] で実施した。糞便堆積部の境界を採材箇所とし、滅菌蒸留水で湿らせた紙ウエス（キムワイブ、日本製紙クレシア(株)、東京）で床の15×15cmの範囲を拭い、糞便を満遍なく付着させて被検材料とした。採材箇所数は10カ所とし、採材箇所間の距離は可能なかぎり広く取った。被検材料は1検体（個別処理）または5検体（プール処理）を1本の50ml遠沈管に入れた。

ヨーネ菌 DNA 検出方法と判定：DNA抽出はヨーネ菌 DNA 抽出キット（ヨーネスピン ver.2, (株)ファスマック、神奈川）を用い、被検材料を入れた50ml遠沈管に滅菌蒸留水20～30mlを添加し、以降は製品のマニュアルに従って実施した。qPCRは糞便中ヨーネ菌 DNA 検出キット（ヨーネジーン・KS, 共立製薬(株)、東京）及びqPCR装置（LightCycler 480 II, ロシユ・ダイアグノスティック(株)、東京）を用いて製品のマニュアルに従って実施した。各農場において、被検材料から1検体以上ヨーネ菌 DNA が検出された場合を環境検査陽性、すべて非検出の場合を陰性とした。

定期及び同居牛検査における検査方法：ELISAは牛の血清を用い、牛ヨーネ病スクリーニング用エライザキット（ヨーネスクリーニング・プルキエ、(株)微生物化学研究所、京都）により実施した。吸光度をマイクロプレートリーダーで測定し、SP値60以上を陽性と判定した。

qPCR及び培養検査には牛の直腸から採取した糞便1gを用いた。糞便からのDNA抽出はヨーネ菌 DNA 抽出キット（ヨーネスピン ver.2, (株)ファスマック、神奈川）を用いて製品のマニュアルに従って実施した。qPCRは環境材料と同様に実施し、ヨーネ菌 DNA が検出された牛を感染牛とした。また、qPCR反応液中のヨーネ菌 DNA 濃度（DNA濃度、pg/well）を測定し、後述の推定式を用いて糞便1g中のヨーネ菌生菌量（排菌量、CFU/g）を求めた。糞便の培養検査はヨーネ菌培養用培地（ヨーネ菌用培地「共立」、共立製薬(株)、東京）を用いて製品のマニュアルに従って行い、ヨーネ菌が分離された牛を感染牛とした。加えて、培養ビン中ヨーネ菌コロニー数（分離菌数）を計数し、それを4倍（培養前処理における糞便の希釈倍率）することで排菌量を求めた。

DNA濃度及び分離菌数からの排菌量の推測：同居牛検査により摘発された感染牛の回盲部リンパ節をホモジナイズし、前述の方法で培養した。なお、当該牛は乳用

表1 環境検査実施農場の概要と環境検査結果

農場 No.	飼養形態	飼養頭数	材料の処理方法	感染牛の排菌量 (CFU/g)	感染牛頭数	環境検査結果
1	肉素	45	プール	3.8×10^6	4	+
2	酪農	290	プール	1.3×10^6	3	+
3	肉素	49	プール	5.5×10^5	5	+
4	肉素	120	プール	2.4×10^5	6	+
5	酪農	120	プール	8.6×10^4	2	+
6	肉素	331	プール	4.9×10^4	14	+
7	酪農	310	個別	3.1×10^4	5	+
8	酪農	1,147	プール	3.0×10^3	12	+
9	酪農	260	プール	7.5×10^2	2	+
10	肉素	94	個別	5.9×10^2	1	+
11	酪農	1,420	個別	2.7×10^2	3	+
12	酪農	106	プール	2.3×10^2	1	+
13	酪農	113	個別	1.6×10^2	1	+
14	酪農	100	個別	9.2×10^1	4	+
15	酪農	393	個別	8.3×10^1	1	+
16	肉素	23	個別	7.0×10^1	1	+
17	酪農	134	個別	6.6×10^1	1	-
18	酪農	112	プール	5.1×10^1	1	+
19	肉素	50	個別	4.9×10^1	3	+
20	肉素	120	プール	2.8×10^1	1	-
21	肉素	70	プール	2.2×10^1	1	+
22	酪農	217	プール	1.2×10^1	1	-
23	酪農	62	個別	1.1×10^1	1	-
24	酪農	243	プール	8.5×10^0	1	-
25	肉素	88	個別	5.3×10^0	1	-
26	肉素	93	個別	5.2×10^0	1	-
27	酪農	62	プール	3.2×10^0	1	-
28	肉素	101	個別	2.2×10^0	1	-
29	酪農	215	プール	1.3×10^0	1	-

酪農：酪農場

肉素：肉用素牛生産農場

個別・プール：環境材料10検体を個別または5検体プール材料として処理

排菌量：糞便1g中のヨーネ菌生菌数

+及び-：環境検査結果陽性及び陰性

牛で、JDを疑う症状はみられなかった。分離されたヨーネ菌は滅菌蒸留水に浮遊させ、前述のqPCRで同定した。Sweeneyら [12] の報告を参考に、ヨーネ菌液を20G針に通して均一に懸濁した後、分光光度計を用いて波長540nmでの吸光度が0.64、すなわちヨーネ菌濃度が 2.0×10^8 cells/mlとなるように調整した。qPCRによりヨーネ菌陰性が確認された糞便1gに、 1.3×10^2 cellsから 5.0×10^7 cellsまで7段階の量のヨーネ菌をそれぞれ添加した。当該糞便を用い、前述の方法でqPCR及び培養検査を実施してDNA濃度及び分離菌数をそれぞれ2反復で測定した。目的変数を分離菌数から求めた排菌量の常用対数値、説明変数をDNA濃度の常用対数値とした一般線形モデルを用い、DNA濃度から排菌量を推定するための推定式を導出した。

環境検査に関する統計解析：目的変数を環境検査結

表2 ロジスティック回帰モデルによる環境検査結果と感染牛の排菌量、感染牛頭数、飼養形態、飼養頭数及び材料の処理方法それぞれの関連の評価結果

変 数	切 片	係 数	P 値
感染牛の排菌量	- 8.3 (4.0)	5.5 (2.5)	0.028
感染牛頭数	- 19 (3,655)	18 (3,655)	0.996
飼養形態	0.61 (0.51)	0.087 (0.80)	0.913
飼養頭数	- 0.71 (2.3)	0.64 (1.1)	0.547
材料の処理方法	0.47 (0.57)	0.32 (0.79)	0.685

※推定値 (標準誤差)

P<0.05: 有意な変数

排菌量: 糞便 1g 中のヨーネ菌生菌数の常用対数値

飼養形態: 酪農場に対する肉用素牛生産農場

飼養頭数: 飼養頭数の常用対数値

材料の処理方法: 環境材料 10 検体の個別処理に対する
5 検体プール材料処理

果, 説明変数を環境検査実施時に摘発された感染牛の頭数, 感染牛の排菌量 (複数の感染牛が摘発された場合は感染牛全頭の合計値) の常用対数値, 飼養形態 (酪農場に対する肉用素牛生産農場), 飼養頭数の常用対数値または材料の処理方法 (個別に対するプール) とした単変量ロジスティック回帰モデルにより, 環境検査結果と各説明変数の関連を評価した. サンプルサイズが小さいため多変量解析は実施しなかった. 次いで, 環境検査の陽性確率が 10%, 50% 及び 90% となる感染牛の排菌量をロジスティック回帰モデルにより算出した.

本調査におけるすべての統計解析は統計ソフトウェア「R」[13] により実施し, 危険率 5% 未満を有意とした.

成 績

環境検査は 29 農場のうち 19 農場で陽性となり, 環境検査の感度は 66% と算出された. 感染牛の排菌量が 7.0×10^1 CFU/g 以上の 16 農場ではすべて環境検査陽性となった (表 1). 環境検査結果に影響を与えらるる項目をロジスティック回帰モデルにより評価した結果, 環境検査の陽性確率は感染牛の排菌量が多い農場ほど有意に高かった ($P=0.028$). 環境検査結果と感染牛頭数 ($P=0.996$), 飼養形態 ($P=0.913$), 飼養頭数 ($P=0.547$) 及び材料の処理方法 ($P=0.685$) に有意な関連はなかった (表 2). 排菌量に基づく環境検査の陽性確率をロジスティック回帰モデルで評価した結果, 環境検査の陽性確率が 10%, 50% 及び 90% となる感染牛の排菌量は, それぞれ 1.2×10^1 CFU/g, 3.1×10^1 CFU/g 及び 7.8×10^1 CFU/g と推定された (図 1).

排菌量の常用対数値 (y) と DNA 濃度の常用対数値 (x) の関係を示す推定式:

$$y = 0.94x + 3.8 (P = 0.002, R^2 : 0.931)$$

が導出された. なお, ヨーネ菌添加量 1.3×10^2 cells の

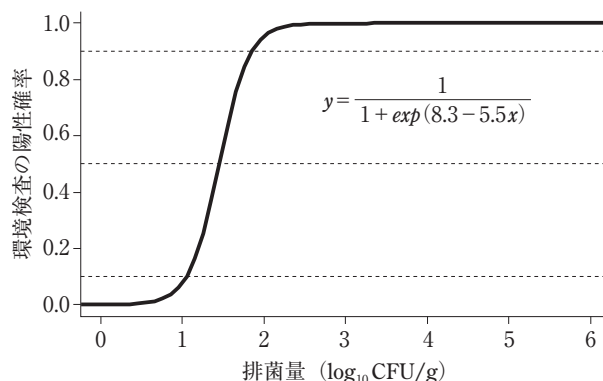


図1 ロジスティック回帰モデルによる感染牛の排菌量に基づく環境検査の陽性確率の評価結果

—: 環境検査の陽性確率の推定値

-----: 確率 10%, 50% 及び 90%

排菌量: 糞便 1g 中のヨーネ菌生菌数

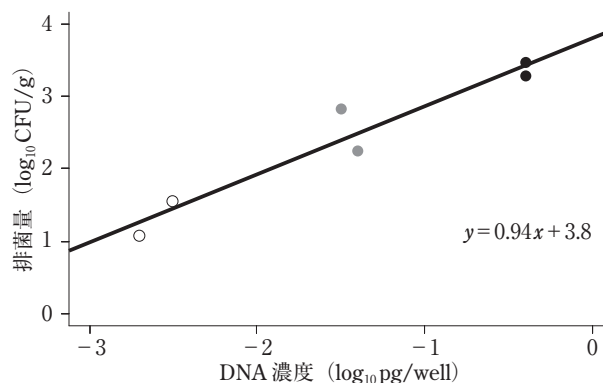


図2 DNA 濃度からの排菌量の推測

—: 排菌量の推定値, 糞便へのヨーネ菌添加量

○: 5.0×10^2 cells

●: 5.0×10^3 cells

●: 5.0×10^4 cells

DNA 濃度: リアルタイム PCR 反応液中のヨーネ菌
DNA 濃度

排菌量: 糞便 1g 中のヨーネ菌生菌数

糞便からはヨーネ菌が分離されず, 排菌量 5.0×10^5 cells 以上の糞便の分離菌数は計数不能多数であった.

考 察

ヨーネ菌 DNA は JD に高度汚染された農場で, 環境中に 2 年間残存した例があり [14], 環境検査結果への影響が懸念された. しかし, 環境検査の陽性確率は採材時点で農場に存在した感染牛の排菌量と関連がみられたことから, 環境検査は採材時点の農場のヨーネ菌汚染状況を反映すると考えられた.

環境検査の陽性確率が 90% となる感染牛の排菌量は 7.8×10^1 CFU/g と推定された. この排菌量は, 発症牛の排菌量 10^8 CFU/g [1] と比較して約 100 万分の 1 と少ない. また, 実験感染例において, 感染成立には 3.0

$\times 10^6$ CFU以上のヨーネ菌の経口投与が必要であったと報告されている [12]。この報告に従えば、発症牛の糞便であれば0.03gの糞便の摂取で感染が成立するが、排菌量 7.8×10^1 CFU/gの糞便であれば感染成立には38kgの糞便の摂取が必要になる。通常の飼養管理において特定の牛の糞便を当該量摂取する可能性は低い。環境検査はJDを伝播させる可能性が低いと考えられるレベルの低度排菌牛が在籍する農場を摘発可能と考えられた。一方、感染牛の排菌量が 7.8×10^1 CFU/gより少なければ、環境検査は偽陰性となる可能性が高い。ただ、このような低度排菌牛は、その時点で感染源となってJDを伝播させる可能性が低く、繰り返し環境検査を実施して排菌量が大幅に増加する前に摘発・淘汰すれば、JD伝播リスクは高くないと考えられた。

本調査ではDNA濃度及び分離菌数から排菌量を推定した。ただ、ヨーネ菌は集塊を形成するため懸濁液中で均一に分散しづらく、qPCRや培養検査結果にばらつきを生じやすい [7]。また吸光度による濃度測定、あるいはqPCRでは生菌だけでなく死菌も検出する [12]。そのため、今回算定した推定値と実際の排菌量には誤差があることを留意すべきと考えられた。

環境検査結果と感染牛頭数に関連はなかった。各農場における感染牛頭数の最大値と最小値の差は14倍であったことに対し、排菌量のそれは約190万倍とはるかに大きかった。値の変動幅がより大きい排菌量の方が環境検査結果により強い影響を与えたと考えられた。環境検査の陽性確率は農場内JD有病率と関連すると報告されているが [9]、農場のヨーネ菌汚染状況の指標としては感染牛の頭数よりも排菌量の方が優れていると考えられた。

環境検査結果に飼養形態による差はなかった。今回の調査で採材箇所とした堆肥舎床のほかに、採材箇所としてミルクパーラーが報告されているが [9, 11]、肉素農場では適用できない。両飼養形態に対応可能である点で、堆肥舎床は採材箇所として適していると考えられた。

材料処理方法の検討結果から、プール処理による環境検査の陽性確率への影響は大きくないことが確認された。また、飼養頭数と陽性確率にも関連がなかったが、これは過去の報告 [10, 11] と一致した。感染牛の排菌量は指数関数的に増減するため、指数関数的な差がないかぎり、環境中ヨーネ菌密度に対する飼養頭数等の希釈効果は大きくないと考えられた。個体検査と比較して大幅に少ない一定の検体数で実施できる環境検査は、特に大規模農場の検査を効率化し得ると考えられた。加えて、環境検査は非侵襲的で牛の保定が必要ないこと [11] から牛及び飼養者の負担も少なく、頻回検査に適すると考えられた。

発症牛を含む高度排菌牛の存在下ではJDの伝播が容易に発生すると予想される。国内において農場の初摘発感染牛が発症牛である場合、非発症牛の場合に比べて同居牛検査でさらに感染牛が摘発されるリスクが3.8倍になると報告されている [15]。また、排菌量が10倍増となると、感染牛がJDを伝播させる同居牛の頭数が1.2~2.2倍となるとも推測されている [16]。感染牛の排菌量の推移は不明な点が多いが、排菌開始から排菌量が高度となるまで典型例では2年程度と報告されており [3, 5]、現在のサーベイランスでは発症牛を含む高度排菌牛の出現を許す可能性がある。環境検査の利点である省力性を活かして頻回検査を実施し、排菌量が増加する前に感染牛を摘発・淘汰することで、JD伝播リスクの低減が可能と考えられた。今後、シミュレーションモデル [3, 4] を用いるなどして、具体的な検査間隔を検討する必要があると考えられた。

以上より、環境検査は国内でのJDサーベイランスにおいて農場レベルのスクリーニング検査として用いることで、JD防疫の進展に寄与できると考えられた。

引用文献

- [1] Chiodini RJ, van Kruiningen HJ, Merkal RS : Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects, *Cornell Vet*, 74, 218-262 (1984)
- [2] 榎原伸一, 菅野 宏, 立花 智 : ヨーネ病が牛飼養農場に与える損失の評価, *家畜衛生学雑誌*, 42, 173-180 (2017)
- [3] Groenendaal H, Nielen M, Jalvingh AW, Horst SH, Galligan DT, Hesselink JW : A simulation of Johne's disease control, *Prev Vet Med*, 54, 225-245 (2002)
- [4] Marcé C, Ezanno P, Seegers H, Pfeiffer DU, Fourichon C : Predicting fadeout versus persistence of paratuberculosis in a dairy cattle herd for management and control purposes: a modelling study, *Vet Res*, 42 (2011), (online), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3053233/pdf/1297-9716-42-36.pdf>), (accessed 2014-05-19)
- [5] Mitchell RM, Schukken Y, Koets A, Weber M, Bakker D, Stabel J, Whitlock RH, Louzoun Y : Differences in intermittent and continuous fecal shedding patterns between natural and experimental *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in cattle, *Vet Res*, 46 (2015), (online), (<http://veterinaryresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13567-015-0188-x>), (accessed 2015-09-14)
- [6] Whitlock RH, Wells SJ, Sweeney RW, Van Tiem J : ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method, *Vet Microbiol*, 20, 387-398 (2000)
- [7] Kawaji S, Nagata R, Mori Y : Detection and Confirmation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Direct Quantitative PCR Positive Fecal Samples by

- the Manual Fluorescent MGIT Culture System, J Vet Med Sci, 76, 65-72 (2014)
- [8] 永田礼子 : ヨーネ病, 日獣会誌, 69, 66-68 (2016)
- [9] Donat K, Kube J, Dressel J, Einax E, Pfeffer M, Failing K : Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in environmental samples by faecal culture and real-time PCR in relation to apparent within-herd prevalence as determined by individual faecal culture, Epidemiol Infect, 143, 975-985 (2014)
- [10] Lavers CJ, McKenna SL, Dohoo IR, Barkema HW, Keefe GP : Evaluation of environmental fecal culture for *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* detection in dairy herds and association with apparent within-herd prevalence. Can Vet J, 54, 1053-1060 (2013)
- [11] Lombard JE, Wagner BA, Smith RL, McCluskey BJ, Harris BN, Payeur JB, Garry FB, Salman MD : Evaluation of environmental sampling and culture to determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* distribution and herd infection status on US dairy operations, J Dairy Sci, 89, 4163-4171 (2006)
- [12] Sweeney RW, Uzonna J, Whitlock RH, Habecker PL, Chilton P, Scott P : Tissue predilection sites and effect of dose on *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis* organism recovery in a short-term bovine experimental oral infection model, Res Vet Sci, 80, 253-259 (2006)
- [13] Ihaka R, Gentleman R : R: A Language for Data Analysis and Graphics, J Comp Graph Stat, 5, 299-314 (1996)
- [14] Moravkova M, Babak V, Kralova A, Pavlik I, Slana I : Culture- and quantitative IS900 real-time PCR-based analysis of the persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a controlled dairy cow farm environment, Appl Environ Microbiol, 78, 6608-6614 (2012)
- [15] Kobayashi S, Tsutsui T, Yamamoto T, Nishiguchi A : Epidemiologic indicators associated with within-farm spread of Johne's disease in dairy farms in Japan, J Vet Med Sci, 69, 1255-1258 (2007)
- [16] Slater N, Mitchell RM, Whitlock RH, Fyock T, Pradhan AK, Knupfer E, Schukken YH, Louzoun Y : Impact of the shedding level on transmission of persistent infections in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP), Vet Res, 47 (2016), (online), (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4772324/>), (accessed 2016-08-15)

The Detection of the *Mycobacterium Avium* Subspecies *Paratuberculosis* in Environmental Samples as a Screening Test to Determine a Herd's Paratuberculosis Status

Shinichi SAKAKIBARA[†], Hiroshi KANNO and Satoshi TACHIBANA

*Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center, 59-6 Kisen, Kawanishi, Obihiro, 089-1182, Japan

SUMMARY

This study evaluated the efficacy of the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) in environmental samples as a screening test to determine a herd's paratuberculosis (PTB) status. MAP DNA was detected in environmental samples from 29 herds at the point of detection of MAP-infected cattle. A logistic regression model was used to assess the association between the probability of detection and the amount of viable MAP in the feces (shedding level: SL) of MAP-infected cattle. The probability of detection increased with increasing the SL of MAP-infected cattle. The SL of MAP-infected cattle associated with a 90% probability of detection was 7.8×10^1 CFU/g. Environmental sampling will make it possible to detect herds including less infectious cattle, and it is simple and cost-effective. It is suggested that repeated environmental sampling will contribute to the progress of the PTB eradication program in Japan.

— Key words : environmental sampling, paratuberculosis, screening test, shedding level, within-herd spread.

[†] Correspondence to : Shinichi SAKAKIBARA (Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center)

59-6 Kisen, Kawanishi, Obihiro, 089-1182, Japan

TEL 0155-59-2021 FAX 0155-59-2571 E-mail : sakakibara.shinichi@pref.hokkaido.lg.jp

— J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 70, 511 ~ 515 (2017)