

県内の牛ヨーネ病におけるリアルタイム PCR 検査結果についての一考察

東部家畜保健衛生所 森西恵子

はじめに

「ヨーネ病防疫対策要領」における発生時およびまん延防止のための検査は、現在、エライザ法等による抗体検査とリアルタイム PCR 法（以下 qPCR）による遺伝子検査を併用して行われている。

qPCR による遺伝子検査の判定方法は、1 回目の qPCR で陽性となった検体のうち、糞便中ヨーネ菌 DNA 量が 0.005pg/well 以上であったものについて再度 qPCR を行い、再び糞便中ヨーネ菌 DNA 量が 0.005pg/well 以上であったものは、ヨーネ菌を大量に排菌している可能性が高いと考え、農家に対し自主淘汰を推奨することとなっている（図-1 参照）。

しかし、現場では、計算上の糞便中ヨーネ菌 DNA 量が 0.005pg/well 未満である検体が散見されており、検査マニュアル上は特に対応を明記していないので現在は特に対応はしていない。

そこで、このような検体に対する対応の参考とするため、qPCR で陽性であるものの、糞便中ヨーネ菌 DNA 量が自主淘汰推奨値未満である個体について、糞便中ヨーネ菌 DNA 量の推移を調査した。

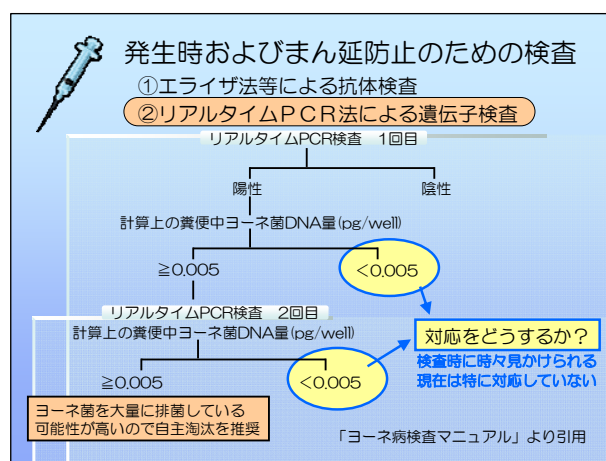


図-1

材料と方法

材料：香川県内における 2008～2010 年度のヨーネ病検査で患畜が摘発された農家 8 戸についての発生確認時の検査およびまん延防止のための検査のうち、qPCR による遺伝子検査の検査データ延べ 2557 頭分。

方法：qPCR で陽性の個体について、その後の検査における糞便ヨーネ菌 DNA 量の推移を比較検討。

結果

①調査農家（8戸）の概要

各農家の検査回数、延べ検査頭数とその平均、延べ患畜頭数とそのうち菌分離や病理検査でヨーネ病陽性と診断された頭数、また qPCR で陽性となった延べ頭数とうち qPCR で自主淘汰対象となった頭数は図-2 のとおりであった。

調査農家 8 戸のうち、菌分離等で陽性となった 2 戸について、qPCR の陽性頭数も多く見られ、自主淘汰対象となった個体もあった。

結果① 調査農家（8戸）の概要

調査農家 (検査回数)	のべ検査頭数 (平均)	のべ患畜頭数 (うち菌分離等 陽性)	のべqPCR 陽性頭数	うち自主 淘汰対象 頭数
A(7)	784(112)	8(0)	0	—
B(4)	183(46)	2(0)	1	0
C(4)	343(86)	10(0)	1	0
D(5)	261(53)	4(0)	4	0
E(4)	145(37)	2(1)	12	0
F(4)	335(84)	4(0)	1	0
G(3)	185(62)	2(0)	0	—
H(3)	321(107)	1(1)	50	4

図-2

②各個体の糞便中ヨーネ DNA 量の推移

qPCR で陽性となった検査の次回以降の検査データを持っている個体は調査対象頭数は 4 農家の計 34 頭であった (図-3)。

また、そのうち qPCR で陽性となった次回以降の検査で再び qPCR 陽性となった個体数は、E 農家で 7 頭中 1 頭、H 農家で 23 頭中 7 頭の計 8 頭であった (図-4)。この 8 頭について、個体別にヨーネ菌 DNA 量の推移を調査した。

結果② 調査対象の牛について

調査対象：qPCRで陽性となった次回以降の検査データを持っている個体

調査農家 (検査回数)	のべ検査頭数 (平均)	のべqPCR 陽性頭数	qPCR 陽性頭数	調査対象 頭数
A(7)	784(112)	0	0	—
B(4)	183(46)	1	1	1
C(4)	343(86)	1	1	0
D(5)	261(53)	4	4	3
E(4)	145(37)	12	11	7
F(4)	335(84)	1	1	0
G(3)	185(62)	0	0	—
H(3)	321(107)	50	41	23

計34頭

図-3

結果③ 各個体のヨーネ菌DNA量の推移

qPCRで陽性となった次回以降の検査で、再びqPCR陽性となっているかどうか

調査農家	菌分離	調査対象頭数	次回以降の検査で qPCR陰性	次回以降の検査で qPCR陽性
B	—	1	1	0
D	—	3	3	0
E	+	7	6	1
H	+	23	16	7

図-4

まず、E 農家の 1 頭の推移は、患畜発生時での 1 回目の検査で陽性となり、その糞便中のヨーネ菌 DNA 量は 0.000059pg/well、発生 3 ヶ月後の 2 回目の検査では陰性、発生 8 ヶ月後の 3 回目の検査では再び陽性となり、ヨーネ菌 DNA 量は 0.002028pg/well、そして、発生 1 年後の 4 回目の検査では陰性に戻った (図-5)。この個体については、qPCR で陽性となった後、陰性と陽性を交互に繰り返していた。

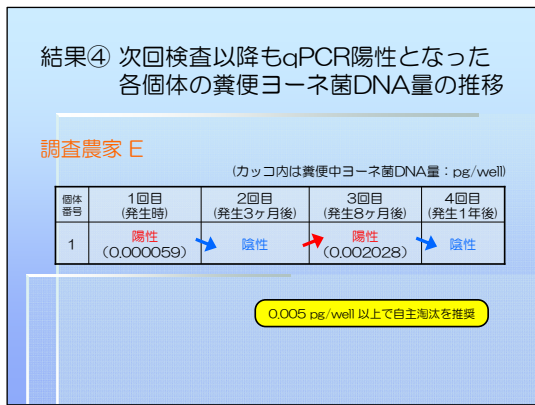


図-5

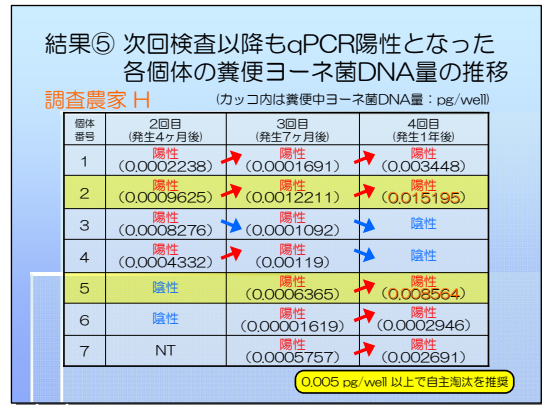


図-6

次に H 農家の 7 頭について調査した。なお、この農場では患畜発生時の 1 回目の検査結果がなかったため、その後 3 回のまん延防止のための検査データを下に調査を行った。

図-6 に 7 頭それぞれの推移を示した。すべての個体について、qPCR 陽性後の検査では再び陽性であった。また、再び陽性となった後の推移について、次の検査でもまた陽性になる個体がある一方、陰性になる個体も見られた。また、H 農家の 7 頭中 2 頭について、qPCR で陽性となった後、再び陽性となり、そのときの糞便ヨーネ菌 DNA 量が 0.005pg/well 以上、つまり自主淘汰推奨基準を上回り、自主淘汰対象となった個体もあった。

まとめおよび考察

患畜発生時に、患畜の菌分離や病理検査が陽性であった農場は、発生時およびまん延防止のための検査でのリアルタイム PCR 検査でも陽性率が高く、その後 3 カ月おきに行われるリアルタイム PCR 検査でも再び陽性となる個体が見られた。

また、リアルタイム PCR 検査で陽性であった個体が、その後の検査でどのように変化したかを個別に調査したところ、陰性に転じる個体があった一方で、糞便中ヨーネ菌 DNA 量が徐々に増加し、自主淘汰推奨値に達する個体もあった。

今回の結果を踏まえて、リアルタイム PCR 検査で陽性であった個体に対しては、その糞便中のヨーネ菌 DNA 量にかかわらず、陽性個体はリスクの高い個体と認識して、その後の経過を観察する、他の家畜との接触を避けるなど、適切な対策を指導した方が良いと考えられた。

参考文献

(独) 動物衛生研究所ヨーネ病研究チーム；ヨーネ病検査マニュアル