

5 管内の牛のヨーネ病防疫における環境検査の活用

根室家畜保健衛生所

○小川 祐子 溝口 達也
増子 朋美

はじめに

北海道では「北海道ヨーネ病防疫対策実施要領」に基づく牛のヨーネ病（JD）発生予防及びまん延防止策が図られているが、発生が減少する傾向はなく、根室管内の JD 対策農場数は 2021 年 10 月末現在、69 戸となっている。JD 対策農場の中には防疫対策が長期化する農場が散見され、飼養者の精神的・経済的負担は大きく、JD 防疫のより効果的な取組が求められている。当所では 2014 年から一部の対策農場で飼養環境のヨーネ菌遺伝子検査（環境検査）を開始し、その結果を消毒重点箇所の確認や飼養管理改善等の防疫指導に活用してきた。今回、これまでに蓄積された環境検査結果と農場の疫学情報等について解析を行い、知見を得られたので報告する。

I 材料

1 環境検査結果

2014 年から 2021 年に実施した 41 農場（乳用一貫経営 36 農場、乳肉複合経営 5 農場）、計 871 カ所の環境検査結果を用いた。環境検査は各牛群の牛床・飼槽・水槽等を中心に、牛舎の規模に応じて一農場当たり 6～44 カ所を湿らせたペーパータオルで拭いた。その拭い液でヨーネ菌遺伝子検査（リアルタイム PCR 法）を実施、判定は遺伝子量にかかわらない定性判定とした。

2 疫学情報

41 農場の飼養頭数、成牛の飼養形態（フリーストール（FS）又はタイストール（TS））、初発患畜頭数、初発患畜のヨーネ菌遺伝子量（排菌量）及び臨床症状の有無、初発生後一年以内の患畜発生頭数（初発一年以内患畜頭数）、外部からの牛の導入の有無並びに飼養管理のリスクの有無を疫学情報として調査した。

飼養管理のリスクは、ヨーネ菌伝播のリスクが高まる環境とし、成牛舎では給餌動線と除糞動線の交差、育成牛舎では育成牛が成牛又は初妊牛と同居、分娩房では分娩房設置なし・分娩房に常時複数頭飼養・病畜房と分娩房の兼用を、リスク有と定義した。

3 糞便スクリーニング遺伝子検査結果

糞便を用いたスクリーニング遺伝子検査（糞便 SC）法は、糞便 10 検体ずつのプール検体を作成し、ヨーネ菌遺伝子をターゲットとしたリアルタイム PCR を実施、陽性となったプール検体について個体毎のリアルタイム PCR を実施し、排菌牛を特定する手法である [1]。当所では糞便 SC 検査を 2016 年から一部の JD 対策農場で実施してきた。今回、41 農場のうち 3 農場で実施した計 9 回の糞便 SC 結果を用いた。

II 統計解析

1 環境検査陽性率と疫学情報の比較

農場内のヨーネ菌の浸潤状況に影響する要因を検索するため、41農場の環境検査陽性率（陽性検体数/採材検体数×100（%））を算出し、環境検査陽性率と疫学情報のうち、飼養頭数、飼養頭数に占める初発患畜頭数の割合及び初発患畜の排菌量について、相関分析を用いて比較した。また、環境検査陽性率と成牛の飼養形態及び成牛舎・育成牛舎・分娩房のリスクの有無について、Mann-WhitneyのU検定を用いて比較した。

2 初発一年以内患畜頭数に関連する因子の推定

初発一年以内患畜頭数を初発生以前の農場内伝播の指標とした報告[2]を参考に、41農場のうち初発生時に環境検査を実施した17農場について、初発一年以内患畜頭数に関連する因子の推定を行った。関連する因子の推定には、階層ベイズモデルを用いた。目的変数は初発一年以内患畜頭数とし、その分布はポアソン分布に従うと仮定した[3]。説明変数は初発生時の環境検査結果及び疫学情報とし、その事前分布を無情報として関連因子と計数比を推定した。推定方法はマルコフ連鎖モンテカルロ法のギブスサンプリング[4]とし、step:3,000、burn-in:300、thinning:3と設定した。モデル選択は偏差情報量基準に基づき増加法で行い、最終モデル式に含まれた変数が初発一年以内患畜頭数と関連があるとした。演算には汎用統計ソフトウェアR[5]及びOpenBUGS[6]を用いた。

3 糞便SC陽性頭数と牛床の環境検査結果の比較

糞便SC結果と環境検査結果の関連を評価するために、牛床の環境検査結果と、各牛床で飼養されている牛群の糞便SC陽性頭数とを比較した。3農場の成牛群、育成牛群で実施した延べ9回18牛群の糞便SC結果を用いた。これら18牛群を牛床の環境検査陰性群と陽性群に分け、それぞれの糞便SC陽性頭数を比較した。比較にはMann-WhitneyのU検定を用いた。

III 結果

1 環境検査陽性率と疫学情報の比較

41農場毎の環境検査陽性率は0～71%だった（図1）。Mann-WhitneyのU検定の結果、成牛舎の飼養管理にリスク有の農場、育成牛舎の飼養管理にリスク有の農場の環境検査陽性率はそれぞれリスク無より有意に高かったが、分娩房におけるリスクの有無及び成牛の飼養形態による差は認められなかった（表1）。相関分析では、飼養頭数、飼養頭数に占める初発患畜頭数の割合及び初発患畜の排菌量と環境検査陽性率との間に明確な関連は認められなかった（表2）。

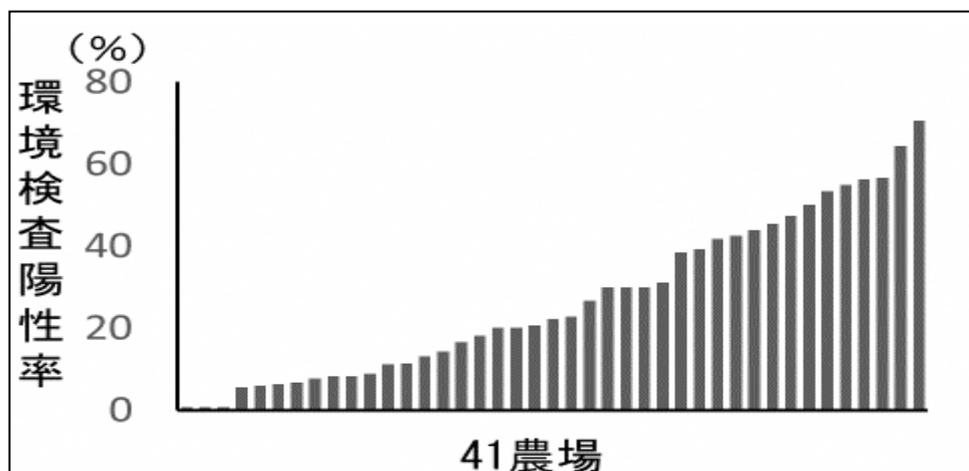


図1 41農場毎の環境検査陽性率

表 1 環境検査陽性率と疫学情報の比較 (Mann-Whitney の U 検定)

疫学情報		環境検査陽性率の中央値 (%)	検体数	P 値
飼養管理のリスク	成牛舎	有	31.0	<0.05
		無	17.4	
	育成牛舎	有	38.5	<0.01
		無	14.3	
	分娩房	有	30.0	0.18
		無	20.6	
成牛の飼養形態		FS	26.7	0.48
		TS	18.3	

表 2 環境検査陽性率と疫学情報の比較 (相関分析)

疫学情報	相関係数	検体数
飼養頭数	<0.001	41
飼養頭数に占める初発患畜頭数の割合	-0.08	41
初発患畜の排菌量	0.23	40

2 初発一年以内患畜頭数に関連する因子の推定

モデル式に用いる関連因子について検討した。小林ら[2]は初発時における JD の農場内浸潤度に関連する三つの因子として①初発時に発症牛がいる、②初発時に複数頭摘発される、③牛舎形態が TS ではない、を挙げた。今回、臨床症状の有無及び初発時の患畜頭数と初発患畜の排菌量の間にも多重共線性を認めたため、これら①（臨床症状の有無）と②（初発時の患畜頭数）の二つの因子を除外した。

階層ベイズモデルによる推定の結果、最終モデル式に含まれた説明変数とその計数比が導出された。初発一年以内患畜頭数は、初発患畜の排菌量が 10 倍多くなる毎に 1.23 倍 (95%信用区間: 1.03~1.48)、育成牛飼養場所床の環境検査陽性は陰性に対して 3.08 倍 (同: 1.41~7.16)、牛の導入ありはなしに対して 4.53 倍 (同: 1.37~14.6) と推定された (表 3)。

表 3 初発一年以内患畜頭数に関連する因子

説明変数	計数比	95%信用区間
初発患畜の排菌量が 10 倍	1.23	1.03 ~ 1.48
育成牛飼養場所床の環境検査が陽性	3.08	1.41 ~ 7.16
牛の導入あり	4.53	1.37 ~ 14.6

3 糞便 SC 陽性頭数と牛床の環境検査結果の比較

牛床の環境検査結果により床陰性群と床陽性群に分け、糞便 SC 陽性頭数を Mann-Whitney の U 検定を用いて比較した結果、環境検査陽性の床で飼養されていた牛群の糞便 SC 陽性頭数は、環境検査陰性群よりも有意に多かった ($p < 0.05$) (図 2)。

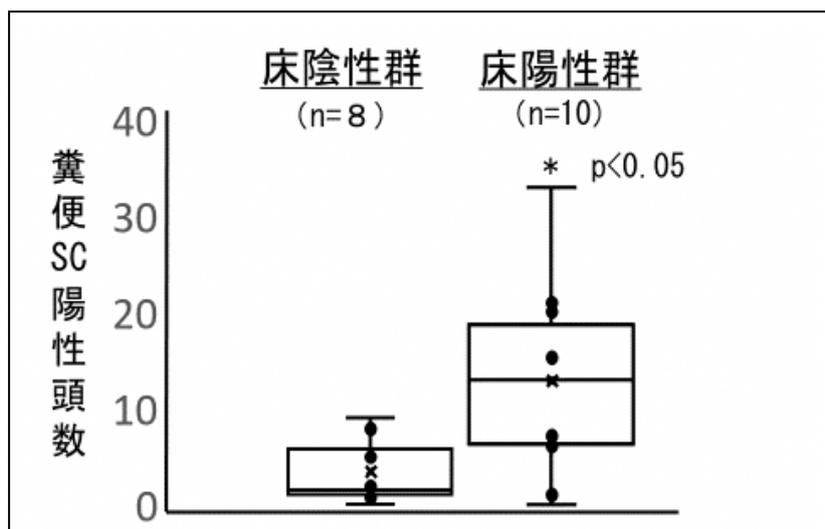


図2 糞便 SC 陽性頭数と牛床の環境検査結果の比較 (Mann-Whitney の U 検定)

IV 考察及び今後の展望

JD 発生農場では、臨床症状を呈している発症牛は「氷山の一角」に過ぎず、その陰に摘発されずに感染拡大の原因となる無症状排菌牛が多数存在するため、農場の清浄化が困難になる[7,8]。その結果、防疫対策が長期化し、飼養者の精神的・経済的負担は大きくなることから、JD 防疫のより効果的な取組が求められている。そこで、当所では 2014 年から環境検査を活用することで、JD 対策農場の飼養者に飼養管理の問題点を明示し、対策の動機付けとしてきた。

今回、環境検査結果と疫学情報等の解析を実施した結果、農場における環境検査陽性率は成牛舎での牛・除糞の動線交差や育成牛と成牛の同居等、飼養管理にリスク有の場合に高い傾向にあった。一方で、飼養頭数や飼養形態、初発患畜の頭数及び排菌量と環境検査陽性率との間に明確な関連は認められなかった。JD 防疫に飼養管理の改善が重要であることは報告されており[3]、今回の環境検査陽性率との比較結果からも、農場のヨーネ菌の浸潤状況は飼養管理の影響が大きく、飼養管理の改善が重要であることが確認できた。

初発一年以内患畜頭数、即ち初発生以前の JD の農場内伝播に関連があった因子は初発患畜の排菌量、育成牛飼養場所の環境、牛の導入であった。患畜摘発までの時間経過が排菌量を増大し[7]、初発患畜の排菌量が多ければ JD の農場内伝播のリスクは上昇する。育成牛飼養場所の環境検査が陽性であることは、後継牛である育成牛への感染経路が遮断できないことを示している。牛の導入は、導入頭数が年間 3 頭以上で JD の農場侵入リスクが上がるとする報告があり[9]、今回の我々の結果もこれを裏付けている。これらから、JD 防疫のためには排菌牛の早期摘発・育成牛舎を中心とした消毒・導入牛によるヨーネ菌の侵入防止が重要と考えられた。

牛床の環境検査結果は糞便 SC 陽性頭数即ち牛群の排菌状況を反映していた。糞便 SC は排菌牛の早期発見や優先とう汰に有用な方法である。しかし、農場のヨーネ菌浸潤状況に応じた運用が必要で[7,10,11]、検体処理は複雑であり[11]、全ての JD 対策農場に糞便 SC を実施するのは困難である。今回、糞便 SC 未適用でも、牛床の環境検査を実施することで牛群の排菌状況を可視化することが示された。同居牛検査陰性時等に環境検査を活用し牛群の排菌状況を監視することは、現行の対策要領において、清浄化に非常に有用と考えられた。

以上から、JD 対策農場の環境検査を実施することは、農場の飼養管理の問題点を明確化し、またヨーネ菌の浸潤状況の把握を容易にすることから、JD 防疫のより効果的

な推進につながると考えられた。今後も環境検査と疫学調査を継続し、JD 早期清浄化及び環境検査手法の標準化に繋げていきたい。

引用文献

- [1] 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門：ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法
- [2] 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(12) : 1255-1258(2007)
- [3] 榊原伸一、上村伸子、藤井誠一、鈴木哲也、矢口弘美、相内花子、谷口有紀子、土田風、山本敦子、川島悠登：牛ヨーネ病の農場内伝播リスク因子の検索と防疫の課題、第 64 回家畜保健衛生業績発表会集録、21-25 (2016)
- [4] 久保拓弥：データ解析のための統計モデリング入門、初版、223-240、岩波書店、東京 (2012)
- [5] R Development Core Team : The R Project for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL <http://www.r-project.org/>
- [6] Thomas A : OpenBUGS developer manual, version 3.2.3.
URL <https://chjackson.github.io/openbugsdoc/Developer/Manual.html>
- [7] 川治聡子：牛ヨーネ病の検査と防疫、家畜診療、66 巻 10 号 599-604 (2019)
- [8] Magombedze G, Ngonghala CN, Lanzas C : Evaluation of the "Iceberg Phenomenon" in Johne's Disease through Mathematical Modelling, *PLoS One*, 8, e76636 (2013)
- [9] Beaunee G, Vergu E, Ezanno P : Modelling of paratuberculosis spread between dairy cattle farms at a regional scale, *Vet Res*, 46 : 111 (2015)
- [10] 福田 寛、末永敬徳、室田英晴、枝松弘樹：スクリーニング遺伝子検査法を活用した牛ヨーネ病高度汚染農場における早期清浄化へ向けた取り組み、第 67 回家畜保健衛生業績発表会集録、33-38 (2019)
- [11] 爲實大地、澄川莉那、一條 満：環境検査及びスクリーニング遺伝子検査法を活用した牛ヨーネ病対策事例、第 65 回家畜保健衛生業績発表会集録、22-27 (2017)