

牛ヨーネ病の疫学と国内の防疫対策

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 番地 6
TEL/FAX : 0155-59-2021/0155-59-2571
E-mail : sakakibara.shinichi@pref.hokkaido.lg.jp

【要約】

牛ヨーネ病は *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (ヨーネ菌) を原因菌とする慢性消化管感染症で、感染牛は乳量や繁殖成績の低下を示し、やがて持続的な下痢症を呈して死亡するため経済的に重要な疾病とされる。国内において牛ヨーネ病は撲滅対象疾病として積極的な摘発・とう汰が実施されており、比較的低い有病率が保たれているが、撲滅の目処は立っていない。撲滅を妨げる要因として定期検査の間隔の長さや検査感度の低さが考えられる。現状では感染牛を摘発・とう汰する前に、感染牛の病態が進行して排菌量が増加し、同居牛へのヨーネ菌の伝播が発生している。比較的感度の高い抗原検査による頻回検査体制を構築し、感染牛を排菌量が低い段階で摘発・とう汰することが可能となれば、農場内・農場間のヨーネ菌伝播を抑えることで効率的に撲滅を進めることができると考えられる。

キーワード：牛ヨーネ病、疫学、頻回検査、排菌量、国内の防疫

はじめに

牛ヨーネ病は *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (ヨーネ菌) を原因菌とする慢性腸管感染症で、感染牛は乳量や繁殖成績の低下を示し [25]、やがて持続的な下痢症を呈して死亡するため、経済的に重要な疾病とされる。牛ヨーネ病は世界的に分布するが汚染度は諸国間で異なり、欧米諸国では清浄化達成を公言している国から農場ベースの有病率 86% の国まで様々である [5, 19]。防疫方針についても、国として厳密で強制的な防疫対策を実施している国から、対策を農場に委ねている国まで様々である [5, 19]。

国内において牛ヨーネ病は、1960 年代以降に輸入牛に端を発する限定的な流行を繰り返して

てきたが、1980 年代以降まん延を許し、全国で発生が見られるようになった。牛ヨーネ病は撲滅対象疾病とされ、1998 年より家畜伝染病予防法に基づく積極的な摘発・とう汰が実施されている。以降、摘発頭数は増加して 2006 年にピークの 1179 頭に達したが、その後は現在まで年間数百頭で推移している。農場ベースの有病率で見れば 2% と比較的低い状態が保たれているが [21]、一方、撲滅の目処は立っていない。今回、牛ヨーネ病の特徴を特に疫学的視点で整理し、国内の防疫対策の現状と課題を検討した。

ヨーネ菌の感染と体内分布

ヨーネ菌は主として経口的に取り込まれ、まず腸粘膜に感染する [34]。腸粘膜内で増殖したヨーネ菌は、糞便中に排泄されると共に、病態が進行すると血行性に全身諸臓器に移行する

[30, 34, 36]。これにより乳汁への排菌 [4, 30, 32] や胎内感染 [33, 36] が発生する。

感受性は幼若牛で高く、様々な条件での実験感染例を調査した結果、感染成立確率は6ヵ月齢未満で75%、6～12ヵ月齢で50%、12ヵ月齢以上で20%と報告されている [37]。一方、成牛でも多量のヨーネ菌暴露を受ければ感染が成立する場合がある [37]。感染成立に必要な最低ヨーネ菌量の報告は、確認された中では、実験感染例において3週齢の牛に 3.0×10^6 CFU のヨーネ菌を経口投与したところ感染成立したというものである [1, 20, 34]。

病態の進行と排菌

感染牛の病態の進行を、糞便への排菌量を基準としてとりまとめた (図1)。牛ヨーネ病の病態の進行は数年の長期にわたり、排菌ステージは無排菌期、低度排菌期から高度排菌期へと遷移する。無排菌期は排菌量が検出限界未満で、臨床症状を示さない。期間は典型例で3年程度とされるが、個体により数ヵ月から十年以上と多岐にわたる [2, 18]。低度排菌期は排菌量が概ね 10^1 CFU/g 以上で、同様に臨床症状を示さない。期間は典型例で2年程度とされるが、個体差が大きい [18]。高度排菌期は排菌量が概ね 10^4 CFU/g 以上で、特に病態が進行した牛は下痢や削瘦といった臨床症状を示す。発症牛の排菌量は 10^8 CFU/g に達するとされる [2]。

乳汁への排菌については、非発症牛に限った調査で高度排菌牛の19%、低度排菌牛の3%で

排菌がみられたという報告 [32]、および発症牛の19%、非発症牛の4%で排菌がみられ、その菌量は発症牛の乳汁で474CFU/mL、非発症牛の乳汁で31CFU/mLであったとの報告等がある [30]。

高度排菌期に至る感染牛は全体の7～21%とされるが [18, 25]、高度排菌牛は概ね1年以内に死廃処分となる [18]。病態進行の有無を決定する要因には不明な点が多いが、摂取菌量 [20]、摂取齢 [20]、牛の遺伝的要因 [23]、菌株の病原性 [24] と考えられている。病態進行のトリガーは妊娠、泌乳、寄生虫の寄生や低栄養等と考えられている [2]。

ヨーネ菌の伝播

牛個体間のヨーネ菌伝播において最も注目すべきは排菌ステージである。感染牛の排菌量が10倍増えるごとに、当該牛から感染を受ける同居牛の頭数が1.2～2.2倍増えると報告されている [28]。また、前述の経口感染成立に必要なヨーネ菌摂取量 [1, 20, 34] を参考にすれば、低度排菌牛では感染に必要な菌数を含む量の糞便または乳汁を同居牛が経口摂取する可能性が低い一方で、高度排菌牛の存在下では容易に伝播が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その後の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 [12]。胎内感染に関しても、非発症期の高度排菌牛の18%で発生したが、

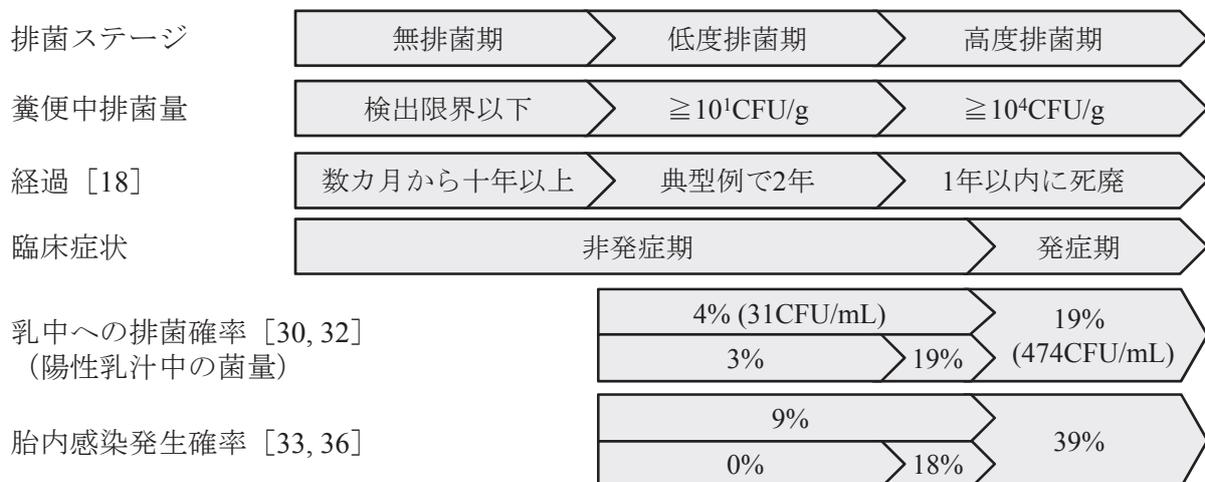


図1 牛ヨーネ病の病態進行と排菌量

低度排菌牛では発生しなかったとの報告がある [33]。発症の有無により区分した報告では、胎内感染は発症牛の 39%、非発症牛の 9% で発生したと報告されている [36]。

感染様式としては、ヨーネ菌経口摂取による水平伝播が主要とされる [4, 16, 24]。なお、育成牛間の伝播は、排菌量が少ないことから限定的であるとされる [16]。胎盤や乳汁を介した垂直感染はマイナールートとされ、感染牛が分娩した子牛のヨーネ菌感染ハザード比は非感染牛の子牛に対して 1.26 倍だが有意差はなかったと報告されている [4]。

農場内の伝播リスクは衛生管理の改善により低減可能である。特に敷料の適切な交換や床の清掃・消毒は重要で、牛体に糞便が高度に付着している農場は本病の発生リスクが高いとされる [8]。感受性の高い幼若牛と成牛の糞便との接触頻度が高いと伝播リスクが高まるため [13]、適切な作業動線の維持が重要である。プール初乳の給与はリスク要因となるため [29]、避けるべきである。

外界でのヨーネ菌の生残と殺菌

ヨーネ菌は外界で増殖できないが、長期生残する [7, 9, 10, 22]。感染の成立や病態の進行には摂取菌量が大きく関わるため、生残期間だけでなく減少割合にも注目することが重要である。

ヨーネ菌の生残の最重要因子は温度と考えられている。スラリー中の 10^6 cfu/g のヨーネ菌が 5℃では 7 ヶ月間、15℃では 3 ヶ月間生存し [9]、同様に 10^4 cfu/g のヨーネ菌が 35℃では 21 ~ 28 日間生存、53 ~ 55℃では 1 日以内に死滅したと報告されている [22]。初乳中のヨーネ菌を殺菌するため加温処理の効果が検証されており、60℃ 60 分の処理で乳中の 10^3 CFU/mL のヨーネ菌を概ね殺菌できるとされている [6]。pH もヨーネ菌の生残に影響し、20℃における D 値(生菌数を 10 分の 1 にする時間)は、pH6 で 25 日に対して pH4 で 12 日であったと報告されている [31]。

糞便は堆肥等として草地に散布されることから飼料中へのヨーネ菌の混入が危惧されるが、堆肥化やサイレージ化の発酵や時間経過によりヨーネ菌は減少するため [7, 10]、飼料からの

感染リスクは高くないと考えられている。

消毒薬としては塩素剤、オルソ剤の適正な濃度での使用がヨーネ菌に有効とされ [21]、石灰乳でも消毒可能とされる [2]。石灰乳の塗布による消毒は物理的な封じ込め効果も相まって効果的な消毒方法と考えられる。

検査法

現在、国内で主に使用されている検査法は、抗原検査である糞便培養及び糞便リアルタイム PCR (qPCR) と、抗体検査である血清 ELISA の 3 種類である。

糞便培養は牛ヨーネ病検査の中では感度が高く、古くから用いられている [2, 35]。ただ、無排菌期の牛を摘発できないことからその感度は 38% とされ、ヨーネ菌の発育が遅いことから結果判明までに 3 ヶ月程度の期間を要する [35]。一方、糞便 qPCR は迅速性に優れ、糞便培養と同等かそれ以上の感度を持つとされる [11]。必要な検査機器・設備の問題から多検体の同時処理は難しいが、10 検体プール糞便を用いることで検査の省力化が可能とも報告されている [17]。

血清 ELISA は多検体の迅速な検査に向くが、交差抗体による非特異反応が確認されている [21]。また抗体上昇は感染後期に起こるため [21, 27]、低度排菌牛は偽陰性を示しやすい。国内で用いられている検査キットとは異なるが、血清 ELISA を用いた場合の陽性確率は高度排菌牛で 75 ~ 92%、低度排菌牛では 15 ~ 19% との報告がある [15, 35]。

その他、省力的な検査法として、堆肥舎床等の農場環境材料を用いた抗原検査 (環境検査) がある。環境検査は感染牛の特定には至らないが、牛の保定が不要で非侵襲的であり、農場あたり一定検体数で実施できることから農場レベルのスクリーニング検査法として国内外で複数の報告がある [3, 14, 26]。

国内の牛ヨーネ病防疫対策の現状と課題

国内では、牛ヨーネ病撲滅のため次のサーベイランスにより感染牛の摘発・とう汰が行われている。2 歳齢以上の牛は少なくとも 5 年ごとの検査 (定期検査) が義務付けられ、血清 ELISA によるスクリーニング検査と、その陽

性牛の糞便 qPCR による確定検査により感染牛を摘発する。感染牛は速やかにとう汰され、感染牛が摘発された農場では、摘発後3年間にわたり、清浄化のためのより綿密な防疫対策が適用される。すなわち、感染牛の最終摘発・とう汰後1年間に3回、その後の2年間に各1回の計5回、6ヵ月齢以上の牛を対象として定期検査と同様の血清 ELISA と糞便 qPCR による検査に加えて糞便培養による検査が実施される。また、当該農場から他の農場へ牛を移動させる必要のある場合には、糞便培養または糞便 qPCR で移動対象牛のヨーネ菌排菌陰性を確認するよう定められている。この対策期間中に感染牛の摘発がなければ、当該農場で発生したヨーネ病は清浄化したものと認められる。

撲滅を妨げる最大の要因として、定期検査の間隔の長さや検査感度の低さが挙げられる。無排菌期から高度排菌期への進行は2年程度で起こりうることから [18]、定期検査の実施間隔である5年の間に高度排菌牛が現れ、農場内で牛ヨーネ病がまん延するおそれがある。加えて、抗体検査をスクリーニング検査としていることも、排菌牛の見逃しにつながる可能性がある。また、無排菌期の牛を摘発可能な検査法が開発されていない現状では、無排菌期の牛が検査で偽陰性を示して他農場へ移動し、農場間の伝播が発生する可能性がある。

国内の牛ヨーネ病防疫対策の今後

現在の防疫対策は、国内の牛ヨーネ病有病率を低値に抑える上で大きな役割を果たしている。しかし、撲滅を考える上では防疫体制の改善が必要である。最大の問題である検査間隔の改善は急務であるが、検査人員の不足に加え、牛個体ごとの検査は農場経営者および畜産関係者にも大きな負担を強いることから、検査間隔の単純な短縮は難しい。そこで、低度排菌牛の摘発率を向上させるための有効かつ現実的な方法として、環境検査 [3, 14] とプール糞便の qPCR [17] による検査体制が考えられる。当所では qPCR による環境検査に注目し、同検査により排菌量 7.8×10^1 CFU/g の低度排菌牛が在籍する農場を、90% の確率で摘発可能と推定した [26]。環境検査を農場レベルのスクリーニング検査として用い、環境検査陽性農場

の牛個体の検査にプール糞便の qPCR を用いることで、省力的かつ血清 ELISA より正確に低度排菌牛を摘発できると考えられる。このような頻回検査体制を構築し、高度排菌牛によるヨーネ菌の伝播を防止することで牛ヨーネ病の撲滅達成が期待される。

牛ヨーネ病は検査法の感度の低さから、撲滅が難しい感染症である。汚染度の低い国内では撲滅の可能性が残されていると考えるが、その達成には長い時間が必要と予想される。我々防疫に携わる者は、今後も防疫体制を評価・改善し、撲滅までの道筋とともにその経済的意義を示していかなければならない。

引用文献

- [1] Begg, D. J., Whittington, R. J. 2008. Experimental animal infection models for Johne's disease, an infectious enteropathy caused by *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *Vet. J.* 176 : 129-45.
- [2] Chiodini, R. J., van Kruiningen, H. J., Merkal, R. S. 1984. Ruminant paratuberculosis (Johne's disease): the current status and future prospects. *Cornell. Vet.* 74 : 218-262.
- [3] Donat, K., Kube, J., Dressel, J., Einax, E., Pfeffer, M., Failing, K. 2014. 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.
- [4] Eisenberg, S. W., Rutten, V. P., Koets, A. P. 2015. Dam *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP) infection status does not predetermine calves for future shedding when raised in a contaminated environment: a cohort study. *Vet. Res.* 46 : 70.
- [5] Geraghty, T., Graham, D. A., Mullaney, P., More, S. J. 2014. A review of bovine Johne's disease control activities in 6 endemically infected countries. *Prev. Vet. Med.* 116 : 1-11.
- [6] Godden, S., McMartin, S., Feirtag, J., Stabel, J., Bey, R., Goyal, S., Metzger, L., Fetrow, J., Wells, S., Chester-Jones, H. 2006. Heat-treatment of bovine colostrum. II: effects of heating duration on pathogen viability and immunoglobulin G. *J Dairy Sci.* 89 : 3476-3483.
- [7] Grewal, S. K., Rajeev, S., Sreevatsan, S., Michel, F. C. Jr. 2006. Persistence of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and other zoonotic pathogens during simulated composting, manure

- packing, and liquid storage of dairy manure. Appl Environ. Microbiol. 72 : 1083-1085.
- [8] Johnson-Ifeorulundu, Y. J., Kaneene, J. B. 1998. Management-related risk factors for *M. paratuberculosis* infection in Michigan, USA, dairy herds. Prev. Vet. Med. 37 : 41-54.
- [9] Jorgensen, J. B. 1977. Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* in slurry. Nord. Vet. Med. 29 : 267-270.
- [10] Katayama, N., Tanaka, C., Fujita, T., Saitou, Y., Suzuku, S., Onouchi, E. 2000. Effects of ensilage on inactivation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. Grassland. Science. 46 : 282-288.
- [11] Kawaji, S., Taylor, D. L., Mori, Y., Whittington, R. J. 2007. Detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in ovine faeces by direct quantitative PCR has similar or greater sensitivity compared to radiometric culture. Vet. Microbiol. 125 : 36-48.
- [12] Kobayashi, S., Tsutsui, T., Yamamoto, T., Nishiguchi, A. 2007. Epidemiologic indicators associated with within-farm spread of Johne's disease in dairy farms in Japan. J. Vet. Med. Sci. 69 : 1255-1258.
- [13] Künzler, R., Torgerson, P., Keller, S., Wittenbrink, M., Stephan, R., Knubben-Schweizer, G., Berchtold, B., Meylan, M. 2014. Observed management practices in relation to the risk of infection with paratuberculosis and to the spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Swiss dairy and beef herds. BMC. Vet. Res. 10 : 132.
- [14] Lavers, C. J., McKenna, S. L., Dohoo, I. R., Barkema, H. W., Keefe, G. P. 2013. 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.
- [15] Lombard, J. E., Byrem, T. M., Wagner, B. A., McCluskey, B. J. 2006. Comparison of milk and serum enzyme-linked immunosorbent assays for diagnosis of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infection in dairy cattle. J. Vet. Diagn. Invest. 18 : 448-458.
- [16] Marcé, C., Ezanno, P., Seegers, H., Pfeiffer, D. U., Fourichon, C. 2011. Predicting fadeout versus persistence of paratuberculosis in a dairy cattle herd for management and control purposes: a modelling study. Vet. Res. 42 : 36.
- [17] Mita, A., Mori, Y., Nakagawa, T., Tasaki, T., Utiyama, K., Mori, H. 2016. Comparison of fecal pooling methods and DNA extraction kits for the detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Microbiologyopen. 5 : 134-142.
- [18] Mitchell, R. M., Schukken, Y., Koets, A., Weber, M., Bakker, D., Stabel, J., Whitlock, R. H., Louzoun, Y. 2015. Differences in intermittent and continuous fecal shedding patterns between natural and experimental *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* infections in cattle. Vet. Res. 46 : 66.
- [19] 百溪英一. 2012. 欧州におけるヨーネ病の発生状況と対策の現状 2012. 日獣会誌. 65 : 636-641.
- [20] Mortier, R. A. R., Barkema, H. W., Bystrom, J. M., Illanes, O., Orsel, K., Wolf, R., Atkins, G., Buck, C. D. 2013. Evaluation of age-dependent susceptibility in calves infected with two doses of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* using pathology and tissue culture. Vet. Res. 44 : 94.
- [21] 永田礼子. 2016. ヨーネ病. 日獣会誌. 69 : 66-68.
- [22] Olsen, J. E., Jørgensen, J. B., Nansen, P. 1985. On the reduction of *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine slurry subjected to batch mesophilic or thermophilic anaerobic digestion. Agric. Wastes. 13 : 273-280.
- [23] Pauciullo, A., Küpper, J., Brandt, H., Donat, K., Iannuzzi, L., Erhardt, G. 2015. Wingless-type MMTV integration site family member 2 (WNT2) gene is associated with resistance to MAP in faecal culture and antibody response in Holstein cattle. Anim. Genet. 46 : 122-132.
- [24] Pradhan, A. K., Mitchell, R. M., Kramer, A. J., Zurakowski, M. J., Fyock, T. L., Whitlock, R. H., Smith, J. M., Hovingh, E., Van Kessel, J. A., Karns, J. S., Schukken, Y. H. 2011. Molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in a longitudinal study of three dairy herds. J. Clin. Microbiol. 49 : 893-901.
- [25] 榎原伸一, 菅野宏, 立花智. 2017. 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.
- [26] 榎原伸一, 菅野宏, 立花智. 2017. 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. 日獣会誌. 70 : 511-515.
- [27] Schukken, Y. H., Whitlock, R. H., Wolfgang, D., Grohn, Y., Beaver, A., VanKessel, J., Zurakowski, M., Mitchell, R. 2015. Longitudinal data collection of *Mycobacterium avium* subspecies *Paratuberculosis* infections in dairy herds: the value of precise field data. Vet. Res. 46 : 65.
- [28] Slater, N., Mitchell, R. M., Whitlock, R. H., Fyock, T., Pradhan, A. K., Knupfer, E., Schukken, Y. H., Louzoun, Y. 2016. Impact of the shedding level on

- transmission of persistent infections in *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP). *Vet. Res.* 47 : 38.
- [29] Sorge, U. S., Lissemore, K., Godkin, A., Jansen, J., Hendrick, S., Wells, S., Kelton, D. F. 2012. Risk factors for herds to test positive for *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*-antibodies with a commercial milk enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in Ontario and western Canada. *Can Vet J.* 53 : 963-970.
- [30] Stabel, J. R., Bradner, L., Robbe-Austerman, S., Beitz, D. C. 2014. Clinical disease and stage of lactation influence shedding of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* into milk and colostrum of naturally infected dairy cows. *J. Dairy Sci.* 97 : 6296-6304.
- [31] Sung, N., Collins, M. T. 2003. Variation in resistance of *Mycobacterium paratuberculosis* to acid environments as a function of culture medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 69 : 6833-6840.
- [32] Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Rosenberger, A. E. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 166-171.
- [33] Sweeney, R. W., Whitlock, R. H., Rosenberger, A. E. 1992. *Mycobacterium paratuberculosis* isolated from fetuses of infected cows not manifesting signs of the disease. *Am. J. Vet. Res.* 53 : 477-480.
- [34] Sweeney, R. W., Uzonna, J., Whitlock, R. H., Habecker, P. L., Chilton, P., Scott, P. 2006. 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.
- [35] Whitlock, R. H., Wells, S. J., Sweeney, R. W., Van Tiem, J. 2000. ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.* 77 : 387-398.
- [36] Whittington, R. J., Windsor, P. A. 2009. In utero infection of cattle with *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: a critical review and meta-analysis. *Vet. J.* 179 : 60-69.
- [37] Windsor, P. A., Whittington, R. J. 2010. Evidence for age susceptibility of cattle to Johne's disease. *Vet. J.* 184 : 37-44.

Paratuberculosis: epidemiology and surveillance program in Japan

Shinichi Sakakibara

Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center
59-6, Kisen, Kawanishi, Obihiro, Hokkaido 089-1182, Japan
TEL/FAX: 0155-59-2021/0155-59-2571
E-mail: sakakibara.shinichi@pref.hokkaido.lg.jp