特別講演

牛ヨーネ病の清浄化推進に期待される疫学的研究

横溝祐一

農業技術研究機構・動物衛生研究所 免疫研究部

はじめに

ヨーネ病（パラ結核）は養牛経営に大きな脅威を与えている家畜法定伝染病の一つである。わが国は1998年4月1日付で家畜伝染病予防法（以下家伝法）施行規則の一部改正を行い、ヨーネ病については搾乳牛及び種畜を対象とした5年ごとのELISAによる検査実施示達に踏み切った（家伝法：5条施行規則第9条）。しかも患畜発生農場は都道府県のヨーネ病防疫対策実施要領のもとで、清浄化確認までELISAと糞便培養法を併用した定期検査プログラムを受けることになった（家伝法51条）。さらに感染リスクの高い同居牛は家畜生産農場清浄化支援対策事業のもとで自主淘汰策をとることもできるようになった（図1）。これはヨーネ病の汚染度がより深刻な欧米豪よりもはるかに徹底した清浄化プログラムであり、わが国が牛ヨーネ病非常事態を宣言し、徹底的な撲滅作戦にうってでた証である。この防疫プログラムはヨーネ病による損耗防止をねらいとしているが、同時に国産の乳肉製品の安全性と信頼度を高めるための重点施策の一環でもあることは言うまでもない。このような清浄化目標を効果的に達成するために、本病による酪農、肉牛生産への経済的影響の評価ならびに診断技術と清浄化施策のコスト・ベネフィットに関し、疫学的視点にたった研究対応が強く求められている。

I) ヨーネ病に対する疫学的研究課題

ヨーネ病牛は長い不顕性感染期間中（図2）に糞便中に大量のヨーネ菌（パラ結核菌：*Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis*）を排出し、また初乳中にもヨーネ菌を含むので、哺乳子牛の感染リスクは極めて高い（図3）。有効な化学療法はなく、またワクチンによる感

図1 家畜伝染病予防法及び家畜生産農場清浄化支援対策事業によるヨーネ病の防疫推進体制：家畜伝染病予防法5条による一斉検査（知事告示）で患畜が摘発された農場は、同法51条による立ち入り検査を一定期間実施し、新規発生がなければ清浄化と見なす、患畜と同居または感染の可能性の高い子牛は清浄化支援対策事業のもとで自主淘汰（補償殺）とする。

染予防も困難であり、しかも下痢消瘦をもって初病後は必ず衰弱死するので²⁶⁾患畜の早期摘発と法令殺処分そして子牛への介糞・介乳感染の伝搬防止をはかる衛生管理が最も効果的な防除対策となる^{8,75)}。しかしながら、家伝法のもとで杓子定規に患畜を命令殺淘汰するだけの防疫施策では生産者はもとより財務当局からの同意と支援を得ることは困難である⁷⁶⁾。また、最近、牛、めん山羊、アルパカ等の家畜にかぎらず野生シカそしてキツネ、アナグマ、テンや野ウサギでのヨーネ菌感染が新たな疫学的問題として注視されており^{2,16)}、反芻家畜と野生動物との相互感染防止への対応にも迫られつつある。

ところで、現行の国家防疫プログラムの円滑な推進と実効をあげるためには、図4に示したように①ヨーネ菌の生態と環境汚染の実態解明、②本病の感染・伝搬を決定づける危険因子の特定、③感染・発病を最小限とするための衛生管理マニュアルの作成、④清浄化達成にいた

連絡先：横溝祐一

〒305-0856 つくば市観音台3-1-5
農業技術研究機構・動物衛生研究所 免疫研究部
Tel：0298-38-7925 Fax：0298-38-7925
E-mail：yokomi@affrc.go.jp

るシミュレーション図式の構築, ⑤防疫費用に対する見返りに関する経済評価, ⑥本病発生による畜産物の市場価格や消費動向への影響評価, ⑦本病発生による農家の財産(土地, 家畜, 生産物, 堆肥など)への経済的影響分析, ⑧本病発生による経営意欲への影響分析と経営改善助成策の構築, ⑨生産者・消費者への本菌の特性と汚染管理体制についての啓蒙, ⑩生産者・流通業者・防疫機関相互の防疫施策に対する合意形成そして⑪防疫施策の都道府県間及び国際間での調整・合意を含めた総合的な対応が必要となる。

以上の課題対応にはヨーネ菌の感染様式とヨーネ病の発病機構の特性⁷⁵⁾を理解した上での疫学的な研究課題設

図2 和牛及び乳牛の発病年齢分布：感染後1年以内に発病することは殆どない慢性病である。哺育期の親子分離が難しい和牛では感染菌量が多くなるため、乳牛よりも低年齢で発病する率が高い。

図3 ヨーネ菌の感染経路：
腸管粘膜固有層～下組織中の肉芽腫病変内で増殖したヨーネ菌は、糞便中に排泄①、乳房・乳頭の汚染②③、血行性に初乳・常乳への移行④、血行性の胎児移行⑤を介して子牛に感染する。患者から生まれた子牛の感染危険度はきわめて高い。

ヨーネ病(JD)の防疫推進に必要な Risk Analysis

Risk Assessment: Hazard Identification, Exposure Assessment, Hazard Characterization, Risk Characterization

- ・ヨーネ菌(J菌)の生体内外での生残・増殖に係わる重要因子は何か。
- ・J菌は何時、何から、どのような経路で感染するか。伝搬・感染成立の危険因子は何か。
- ・J菌は何处で増殖し、どのように保菌・排菌され、どのような時期に発病を誘起するか。排菌、発病誘発の体内外の危険因子は何か。
- ・JDは動物の健康・生産性、生産物の品質・安全性、市場での販売量そして環境生態系にどのような影響を及ぼすか。

Risk Management

- ・J菌は経営方法、衛生管理方法をどのように改善すれば最も効果的・経済的に感染・伝搬を防止し、生産性の損耗、生産物や環境のJ菌汚染度を最小限に制御できるか。

Risk Communication

- ・どのような防疫施策が防疫員、生産者、消費者、行政側からの合意が得やすく、かつ国際的に通用し、最も適切な投資効果を生むか。

図4 ヨーネ病への疫学対応課題

計が必須となる。本稿ではヨーネ病が増加してきた背景、疫学調査に利用される診断技術の問題点そしてヨーネ病の防疫推進に必要な疫学研究課題を述べる。

Ⅱ) 牛ヨーネ病の発生状況と問題点

1) 国内の発生現況

1996～2000年次の5年間におけるヨーネ病法令殺頭数は3,331頭に達した(図5)。加えて、1999年から2年間で3,181頭が生産牧場清浄化支援事業のもとで自主淘汰され、牛舎消毒器整備費も含めて拠出事業費は約8.8億円にも達した。1996年次までの300頭未満から1997年次に急遽574頭へと急増に転じたが、これはELISA検査頭数が大幅に増加したことが原因である(図5)。事実、清浄化

図5 牛ヨーネ病法令殺頭数の年次別推移：増加傾向にあった発生数は2000年次には約10%の減少に転じた。

の緊要性を認めた北海道では1997年次から自主的検査範囲を非発生農家にもひろげ、ついで1998年度からは家伝法施行規則の改正に伴い2歳以上の全繁殖用雌牛の一斉検査を開始した^{14,76)}。そしてELISA検査頭数は2年間で544,666頭（乳牛503,810頭，肉牛40,856頭）に達した。以後は糞便培養を併用した発生農場対象の清浄化定期検査及び移動牛の検査に限定し、2000年次の患者発生数は約10%の減少に転じた。すでに清浄化に成功したいくつかの農場もある^{1,27,38)}。

図6に示したように、本病の発生は北海道以外にも1都35府県に及んでいるが、飼養牛頭数ならびに検査頭数ともに群をぬく北海道が圧倒的に多く、1998年1月～99年9月までの全国のヨーネ病発生戸数408戸中307戸（75%）が、また1423頭中1239頭（87%）が北海道事例である。ちなみに、北海道の検査農家戸数13,265戸（乳牛10,555戸，肉牛2,710戸）のうち陽性戸数は1.73%相当の229戸（乳牛166戸，肉牛63戸）である。そして334頭（乳牛229頭，肉牛105頭）の抗体陽性牛が摘発された。さらに家伝法51条に基づくELISAと糞便培養による立ち

入り検査では、同期間に乳牛513頭，肉牛436頭が摘発された¹⁴⁾。肉牛での陽性率が乳牛に比べてはるかに高いが（乳牛0.04%，肉牛0.26%），これは哺乳子牛と成牛との同居ならびに育成段階での肉牛特有の密飼方式による感染伝搬助長に原因がある。

2) 国内発生経過と発生源

ところで、わが国の最初のヨーネ病摘発例は1930年に英国からの輸入されたショートホーン種畜であるが、詳細な病性鑑定第1報告例は1954年に米国 Wisconsin 州から輸入され、1959年に静岡県下の種畜牧場で発病したホルスタイン種乳牛である⁷⁶⁾。1960年代後期には北海道のN種畜牧場で米国産輸入ホルスタイン種牛がもとで搾乳牛に集団発生をみた（同群の1頭の臨床，免疫応答の長期観察記録は文献参照⁶⁹⁾）。また1960年代末に北海道十勝地方に輸入された3頭の米国産乳牛が導入先または転売先の11農家の35頭に伝搬させた疫学調査記録が残されている⁷⁶⁾。ついで1980年代になると黒毛和牛での集団発生が東北，北海道，関東で相次いだが、この感染源は

図6 牛ヨーネ病の道府県別の発生状況：数値は2年間の患者発生頭数。北海道の発生はELISA検査頭数の圧倒的の多さをも反映している。

某種畜牧場に導入された米国産の数頭のアンガス種畜が感染源と推定されている。ヨーネ病は1971年に家畜法定伝染病に指定されたとはいえ、1970年末までは年間数頭の、それも輸入牛とその子牛に限定した発生にとどまっていた。このように、わが国の乳・肉牛のヨーネ病は米国産の保菌繁殖牛に源を発し、その放置が同居群を汚染し、ついで不顕性保菌牛の移動・市場出荷により全国的に拡散したものと推測できる。ちなみに1976～1997年の22年間に輸入検疫で摘発されたヨーネ病患者・疑似患者総数は282頭であり、その54%を米国産が占めているのである¹²⁾。無論、検疫で摘発されずに導入先で発病した症例も多い⁷⁵⁾。

3) 海外の発生状況

1992年に報告されたウイコンシン州での10牛群・855頭を対象にした糞便及び剖検時培養検査による疫学調査では、182頭(21%)で感染が確認され、牛群の汚染率は実に7～60%以上を記録した³¹⁾。また同州で1994年に158牛群・4990頭を対象として行われたELISA抗体調査では、抗体陽性例を含む群が50%にも達し、個体レベルでは7.3%の抗体陽性率を示した。これをもとにした同地域での推定汚染率は牛群で34%、個体レベルで4.8%と算定された¹¹⁾。1994年に報告されたニューヨーク州での39,797頭を対象とした大規模な糞便培養検査では、2470頭(6.2%)もの高い陽性率が示された⁷⁵⁾。他方、1997年に報告されたミズリー州でのELISA抗体調査では89牛群の47%(乳牛群74%、肉牛群40%)が、また個体レベルでは1954頭のうち98頭が陽性であった⁶³⁾。また1999年に報告されたミシガン州での乳牛121牛群(3,886頭)を対象とした血清疫学調査では、牛群レベルで54%、個体レベルで6.9%の抗体陽性率が記載されている⁷⁵⁾。米国ではELISA、糞便培養などの定期検査とヨーネ病発生歴から自主申告性の清浄度ランク付けを州ごとに行っている²⁶⁾。国家防疫プログラムを1993年から開始したオーストラリアでは1998年までに1968牛群での発生届け出を記録し³⁰⁾、またビクトリア州では30万頭の成牛をELISAで検査し、4,853頭の陽性牛を補償殺処分とした²²⁾。オランダ、フランス、英国でも、ヨーネ病の汚染度はわが国よりもはるかに厳しい状況にあり、フランスでは子牛を対象にワクチンによる発病予防策を採用している^{6,22,26,30)}。

4) 輸入検疫体制の問題点

上記のような高いヨーネ菌分離率と抗体陽性率を示す疫学調査報告をみると、米国の酪農地帯を中心にヨーネ病汚染がかなり深刻な状況に陥っていることが理解できる。これらの地域は現在でもわが国の乳牛種畜の主な購

買先地域であるが、出国検疫では、検疫前20～60日の期間に生産農場においてヨーニンとCFテストを受けるだけである。輸入業者の本病防疫への意識向上により、1970～80年代に比べて過去10年間の動物検疫所でのヨーネ病摘発率は格段に減少しているが²⁵⁾、今後は米国の輸出検疫体制に対してOIEコードあるいはカナダ、オーストラリアに課しているような、出荷元牧場の過去5年間のヨーネ病非発生の申告あるいは出荷牛(同居牛)のELISA及び糞便検査を義務づけることが望ましい²⁵⁾。今後は、輸出入当該牛はもとより生産農場牛のプール糞便のPCR検査もOIEコードに加えることを検討すべきであると考ええる。

Ⅲ) 疫学調査に利用する診断技術の用法と問題点

1) ヨーニン反応

ヨーネ病は図7に示すような排菌、臨床症状、免疫応答の経過をとるので、一つの診断法のみで疫学調査を行うべきではない。感染直後に摂取菌の一時的な排菌があるものの、1歳未満で糞便培養陽性となることは少ない。細胞性免疫応答を検出するIFN γ ELISA(抗原刺激されたT細胞から産生されたIFN γ を定量)^{5,54)}やヨーニン反応は大量菌の感染を受けると2～4ヶ月後に陽転するため排菌開始前の感染早期牛の診断法としての利用価値が高い。ちなみに、1993～1997年に輸入検疫でヨーネ病牛として摘発された89頭の診断根拠として、23頭がヨーニン反応であり、その86%が12ヶ月齢未満であった。他の35頭はELISAだが、その85%は24ヶ月齢以上であ

図7 ヨーネ病の感染から発病の経過、免疫応答、糞便中排菌モデル：ヨーネ菌感染後に細胞性免疫応答が、ついで液性免疫が上昇する。糞便中へのヨーネ菌排菌は、感染1年後に活性化する。症例は分娩後に顕性化することが多い。

り、また31頭が糞便培養による摘発であった¹³⁾。注目すべきはヨーニン反応による摘発牛の11%はヨーネ菌分離陽性であり、育成期の感染牛の摘発に大いに役だつことが理解できる(図8)。

2) ELISA抗体検査

ELISAは多検体処理の容易さ、判定の迅速さからスクリーニングテストとしての利用価値が高い^{9,11,17,22,41,56)}。実際、家伝法5条検査で多数の病牛が摘発され農場汚染度の進行防止に大いに役立っている。牛群中に病態のすすんだものが含まれる場合は、ELISA陽性個体の糞便培養陽性率は70%を超えることが多い。実際、青森県の繁殖肉用牛飼養地域で家伝法5条、51条下で摘発された4頭が直接鏡検で、9頭がELISAで、また8頭が糞便培養で摘発され、ELISA陽性牛8頭は糞便培養検査で全頭陽性を示した⁵⁰⁾。また静岡県の一酪農家では家伝法5条検査で7頭のELISA陽性牛(非臨床型)が摘発されたが、うち6頭が糞便培養で陽性であった⁴³⁾。ただしヨーネ菌の増殖・排菌が活発化するまでは抗体が陽転しにくい(7図)、排菌数の少ない牛ではELISA陽性率が低いことは避けがたい¹⁴⁾。北海道での最近のヨーネ病患者摘発根拠としては、460頭が糞便培養検査で、また231頭がELISA検査によるものであり、両検査で陽性なのは91頭にすぎなかった¹⁴⁾。北海道では培養陽性で摘発される牛の大部分は排菌レベルの低いものが増えてきており、糞便培養陽性ながらELISA抗体陰性の割合が多くなることはいたしかたない。著者は、培養法、ELISAの両技術の開発製品化に関わり^{73,74)}、防疫対策での両法併用の必要性を強調してきた。著者が1984年に開発したヨーネ病診断用ELISA^{70,71,72,74)}は現在もわが国で共立製菓から製造販売

図8 輸入検疫で摘発されたヨーネ患畜牛の診断方法と牛の年齢の関連¹³⁾：ヨーニン反応は若齢牛の摘発に有効である。

されている他、米国、オーストラリア、デンマークなどでも広く利用されている^{4,11,39)}。

3) 糞便培養検査

糞便培養法は排菌牛摘発法として最も高い信頼性をもつが、感染1年未満では排菌が不活発であること²³⁾(図7, 9)、また判定に6~8週間程度の長期間を要することが欠点であり、特に糞便中の菌数が少ないと、コロニー検出に4ヶ月もの長期間を要することもある²³⁾。また培養方法により排菌牛摘発精度は大きく影響を受ける¹²⁾(図10)。今後、培養法やPCRによる菌検出法の改良が農場汚染リスクを低下させるための最重要課題となる^{24,40)}。無症

図9 ヨーネ病汚染群の検査牛の年齢と糞便培養陽性率：1歳未満の培養陽性牛は近い²³⁾。

図10 糞便培養法の手法の差違のヨーネ菌分離検出感度への影響：現行培養法Aに比べて液体培養地と放射活性測定法及びPCRを組み合わせた改良培養法Eの感度は高い¹²⁾。

状態には保菌しながら排菌しないもの^{48,52,60)}や間歇的に排菌する期間があることも考慮して検査法を運用する必要がある⁵²⁾。米国の大規模濃厚汚染牛群を対象とした清浄化試験では、4年間で摘発された排菌牛の内、1回目の検査では38%しか摘発できなかったことが報告されている⁶⁵⁾(図11)。このことから現行の51条検査による患畜発生農場の清浄化プログラムでは3~6ヶ月間隔のELISAと培養検査を用いて繰り返し検査を実施している。汚染群の摘発には5頭のプール糞便培養検査でも個体検査と感度は同じであるという成績あり²⁴⁾、省力化の検討課題となるだろう。ところで、密飼状態の肥育牛舎においては、1頭の大排菌牛の存在により汚染飼料・敷料の摂取・通過菌により同居牛検査牛が培養陽性(無論ELISA検査では陰性となる)と判定されることも起こりうる(感染の可能性が高いので殺処分対象となる)。

4) 病性鑑定結果の汚染度評価への利用

患畜は埋却または化製場での処理となることが多いが、家畜保健衛生所での病鑑成績は同居群や飼育環境の汚染度を知る重要な手がかりとなる。ELISA陽性の患畜の中には病理組織検査や現行培養検査でヨーネ病感染の確定できない症例もある⁷⁴⁾。著者は家伝法5条検査による患畜摘発農家の牛群汚染度目安として初発患畜が発病していれば++++、無症状で糞便培養陽性なら+++、糞便培養陰性/組織病変陽性なら++、糞便培養、組織病変、組織中菌の全てが陰性なら+とみなしている。++++農場では数年以内に同居牛での患畜続発の危険性が高いが、+ではその危険性は低いとみられる。農場の汚染度目安が+で、患者摘発3ヶ月後の全同居成牛検査でも全頭ELISA・培養検査ともに陰性ならば農場汚染レベルが極めて軽度であったとみなし、以後の定期検査回数を減ら

図11 糞便培養法による保菌・排菌牛の定期検査による摘発経過⁶⁵⁾

すことも今後の検討課題となろう。ところでELISA陽性患畜の病鑑検査で病変陰性であっても安易に抗体非特異陽性例と解釈すべきではない。実際、病理検査では陰性のELISA陽性患畜のうち菌分離またはPCRでは陽性という症例報告や⁴⁴⁾、病鑑検査対象外の腸管部位やリンパ節の陽性病変を見逃した症例もある。また現行培養検査が陰性でも、感度を改善した液体増菌培地PCR検査法ではヨーネ菌検出という報告もある⁴⁵⁾。

Ⅳ) ヨーネ病の清浄化への疫学研究課題

1) リスクアセスメント

(1) ヨーネ菌の感染力

糞便中に大量のヨーネ菌を排菌する発病牛1頭を数日間放置しただけで、牛舎、放牧地は濃厚汚染を受けるが、濃厚汚染群ですら1,000頭あたりの年間発病数は20頭前後とされる⁷⁵⁾。これは感染してから発病にいたるまでの期間が2~10年にわたることなどから、多数の子牛が大量排菌牛からの暴露を同時に受けても一斉に発病しないためである(図2)。このため、ヨーネ菌の伝搬力はあまり強くないとみられがちであるが、密飼状態におかれた哺乳子牛や育成牛群の感染率は極めて高くなる。事実、5~6年間にわたり下痢・削瘦牛を内科的治療対応のみで見過ごしてきたため、ほぼ群内全頭にヨーネ菌感染伝搬してしまい、ついに牧場閉鎖に追い込まれた事例も著者も何度か見聞きしてきた。以下に紹介する肉牛でのヨーネ病発生例の記録はヨーネ菌の伝搬力の凄まじさを伝えている: 1997年3月、黒毛和種67頭、乳牛73頭飼養の北海道のフリーストール農場で1頭の発病牛摘発、ついで同居牛の検査で18頭の患畜を摘発、さらに以降1ヶ月間隔の検査開始から98年1月までに黒毛49頭、乳牛21頭の患畜を摘発した。結局8年時に生まれた自家産黒毛27頭が患畜となった⁶⁸⁾。

(2) 年齢と感染危険度

ヨーネ病の汚染進行の程度を決定づける最大の要因は、感染感受性が極めて高い哺乳子牛と成牛との接触率であり、これが高いほど群内感染率は増加する⁸⁾(図12)。わが国のヨーネ病発生肉牛群での感染率・発病率は乳牛群に比べて格段に高いが、これは哺育期における親子分離が困難であり、成牛と子牛の接触密度、すなわち感染機会が著しく多いためである。自家生産維持の一貫経営肉牛牧場では育成牛の汚染率が50%も越えることがある。上記の肉牛集団発生事例でも、集団発生危険要因として、病性鑑定の遅れ、親子長期同居飼育、冬季舎飼期の密飼をあげている⁶⁸⁾。牛に限らずヨーネ菌は新生期から数日間が最も感受性が高いことは実証されているが、汚染地

図12 子牛の衛生管理と牛群内汚染度の関連：子牛の成牛の接触度が高いほど、牛群の汚染度は速くすみ、重度となる³⁾。

への育成預託で感染した症例もあるので⁸⁾、離乳期以降は感染しても排菌・発病への病態進行がないとは断言できない。

(3) 飼養形態と感染危険因子

糞便を汚染源として伝搬するヨーネ病では、子牛の飼育管理法だけでなく、繁殖牛の衛生管理法、牛舎・器具機材の清浄度管理、堆肥の処理状況、運動場の活用法によって大きく影響を受けることは当然である¹⁵⁾。Obasanjoらは糞便培養とELISAで牛群のヨーネ病汚染度を調査し、いくつかのヨーネ菌感染危険因子のオッズ比（各危険因子暴露群の感染率を非暴露群の感染率で除した数値）を解析した⁴⁷⁾。その結果、異常臨床症状のない群を1とすると慢性体重減少と下痢があればオッズ比は13に、また牧草に糞便を還元しそれを自家還元に供するとすれば非還元群に対するオッズ比は10.3に、また培養陽性牛をすみやかに淘汰した群を1とすると、その放置群では403倍のオッズ比を示した。またJohnson-IfearulunduらはELISA（感度64%，特異性96%）を用いて83牛群の24ヶ月齢以上牛を対象に飼育形態、衛生管理法とヨーネ病汚染危険度の関連を調査した。そして搾乳牛用の運動場（感染・保菌牛と非感染牛の接触危険度が增加する）使用群では非飼養群に比べてオッズ比は3に、またカーフハッチ使用時に清掃励行群では非励行群に比べて0.3に、牧草地に石灰散布群では非散布群に比べて0.2となることを示した¹⁹⁾。今後、わが国の乳・肉牛の飼養実態、特に子牛の哺乳・育成方法、堆肥の処理法などの現場を詳細に調査し、ヨーネ病の危険因子を明らかにする必要がある。

2) リスクマネジメント

(1) 成牛との接触回避

感染動物の早期診断・摘発・淘汰と幼弱家畜の衛生管理がヨーネ病防疫の基本である^{1,67,76)}。Collinsらは防疫対策開始時に汚染率11%を示した100頭規模の牛群に対し、感度70%，特異性99%の診断法を用いて摘発・淘汰処置を続けた場合の汚染率の推移をシミュレーションで表した¹⁰⁾。これによれば1%未満にまで清浄化をすすめるためには約15年もの長期間を要する。注目すべきことに、1頭あたりの成牛が子牛と接触する率を群平均で0.5以下（1年に1頭対1頭であれば1とする）にすれば、それだけでも同様の汚染度低下が得られる。さらに診断・淘汰と子牛衛生管理を併用すれば、清浄化速度はさらに速くなり、ほぼ5年で1%以下の汚染度にまで到達することができるという（小谷はCollinsのモデルのエクセル利用版を解説している³⁴⁾）。実際、著者が防疫に関わった1,000頭規模の大規模一貫経営肉牛群では、当初のELISA抗体陽性率が15%にも達していたが、定期検査（年3回にわたるELISA，ヨーニン，1歳以上の全個体の糞便培養）と感染の疑わしい牛の淘汰ならびに哺乳子牛の衛生管理（直接哺乳から人工哺乳切り替え）を徹底した結果、ほぼ4年で最終検査時の成牛抗体陽性率をゼロにすることができた（図13）⁷⁹⁾。

(2) 介糞感染防止の衛生管理

病牛発生後の牛舎の消毒と汚染堆肥の処理法は、群汚染リスク軽減に大きく影響する。ヨーネ菌は消毒薬や加熱処理に対してサルモネラや大腸菌よりも抵抗性が強い。汚染牛舎のヨーネ菌完全殺滅には水洗後に石灰乳（生石灰を水で溶いたもの）の散布または塗りこみが最も効果

図13 ヨーネ菌濃厚汚染和牛群における防疫プログラムの実施と清浄化過程：全頭に対し糞便培養，ELISA，ヨーニン反応を年3～4回実施し，陽性牛の逐次淘汰と徹底的な子牛の衛生管理をすすめ，ほぼ4年で清浄化を達成した⁷⁹⁾。

がある^{28,35,36)}。踏み込み槽には持続性塩素剤が有効である³⁵⁾。汚染された放牧場や運動場の消毒は困難であるが、牛舎外の乾燥条件下では直射日光を受ければ、100万個/gのヨーネ菌も1ヶ月程度で死滅するとされる³⁶⁾。できれば汚染牧野は1年間程度休牧する必要があるだろう。また厩肥中のヨーネ菌は完熟堆肥化の温度条件下では完全に死滅するが²⁷⁾、汚染牛舎由来の堆肥の牧草地への利用は避けた方がよい。

(3) 介乳感染防止の衛生管理

子牛への感染防止には生直後からの親子分離が理想的である¹⁶⁾。感染牛の初乳にはヨーネ菌が混入している可能性が極めて高いので^{33,55,56,62)}、母牛の糞便とともに子牛感染の最大リスクファクターとなる(図3, 14)。したがってプール初乳・常乳を利用すれば、個別カーフハッチ飼育の条件下でも集団感染は容易におこる⁷⁶⁾。このリスクは初乳の加熱処理(抗体を失活させない程度の温度と時間を選択)により解決できる³⁷⁾。生理食塩水で1.2倍程度に希釈すれば加熱による凝固を回避できるし、農家での自家加熱処理も可能だが、すでにヨーネ菌フリー加熱処理初乳製剤(商品名ヘッドスタート)が市販されている。肉牛については、3ヶ月にも及ぶ直接授乳に加えて、舎外、放牧形式を問わず何組もの母子が混飼されるため、1頭の感染母牛が施乳した他の子牛にまで感染を伝播させる危険性が大きくなる(特に黒毛和種は他牛の子牛の吸乳に寛容であるという)⁷⁶⁾。肉牛に限らず乳牛においても繁殖牛群でのリスクマネジメントとして、初乳の衛生管理、単独牛房での分娩、直接授乳方式から人工乳飼育方法への切り替えを検討すべきと考える^{67,76)}。また大規模

乳牛農家で普及しつつあるフリーストール牛舎では不衛生な分娩舎で多数の新生子牛が娩出されている。ここにヨーネ菌排菌母牛が1頭でも混在すれば、多くの子牛達は確実に感染を受けることになるので、個別分娩房の設置が垂直感染のリスク回避には必須であろう。

3) 経済疫学的な課題

(1) 防疫の必要性

ヨーネ病の防疫推進には自主淘汰助成金を中心に高額の国家予算が投入されている。また生産者や流通仲介者には家畜伝染病予防法にもとづく定期検査や係留検査の遵守を義務づけ、少なからぬ経済的負担を強いている。このようにコストの嵩む防疫行政に対する合意と協力を得るためには経済疫学的視点にたった費用対便益査定が必要であろう。そもそもヨーネ病を国家防疫対象とした理由は、1) 予防・治療はもちろんのこと完全診断(全感染動物を摘発する意味)が困難であること、2) 発病動物はもとより不顕性感染動物の生産性・経済価値に大きな損失をもたらすこと、3) 糞便中に大量に排出されるヨーネ菌の外界環境生存性が強く、消毒・殺菌も困難であること、4) 清浄化に要する経費・期間が農場経営に大負担を強いること等である。

(2) 生産性の直接損害評価

上述のとおり、著者はヨーネ病に濃厚感染した1,000頭規模の一貫生産和牛群を対象に現行の診断技術を用いた摘発・淘汰と子牛の衛生管理法の併用による清浄化に取り組んだが、清浄化には4年余を要した⁷⁵⁾。またヨーネ病に汚染した子牛生産繁殖雌和牛群を対象とした初歩的損失分析から不顕性感染牛群の生産性低下は15%にも達すること、感染繁殖牛の早期処分や消毒薬、採草地使用制限にかかわる経費が莫大な額にのぼることを初めて試算した⁵⁸⁾(図15)。Ottらはヨーネ病の有症状牛淘汰率が10%以下群及び10%以上の乳牛汚染群での年間生産損害額は、年間7800kg生産の健康群に比べて、平均乳量でそれぞれ179kg, 748kg, そして販売金額換算ではそれぞれ61ドル, 245ドルと算定している⁴⁶⁾。最近、一酪農家で21頭中7頭がELISAで、また5頭が糞便培養によりヨーネ病患者畜(全頭とも下痢陰性)として摘発されたが、本農家の乳量生産性は激減したという⁴³⁾。またJohnson - Ifearulunduらの成績によれば、乳牛の感染群では平均体重増が劣るとともに空胎期間が陰性牛に比べて28日延長するという^{20,21)}。

図14 ヨーネ菌不顕性感染牛の乳房上リンパ節及び乳汁からのヨーネ菌分離：感染母牛の初乳及び哺乳子牛への重要感染源となることを示す

(3) 生産性の間接的損害評価

ヨーネ病発生による直接生産性阻害(産乳、産肉への

図15 一貫経営黒毛和種生産農場におけるヨーネ病発生による生産性の低下⁵⁸⁾：無症状ELISA抗体陽性率は15%の増体重量減少

量的・質的低下)の解析法に加えてヨーネ病汚染群から家畜市場への子牛・繁殖素牛の出荷制限による間接的な生産阻害額や消毒処置、初乳衛生管理、堆肥処理に関わる費用そして家伝法にもとづく検査費等の評価法の確立などが重要課題となる¹⁵⁾。ヨーネ病発生にともなう経済的損出と防疫による経済効果を定量的に表現することができれば、生産者からの国家防疫策への理解も得られ清浄化事業の推進も円滑化するであろう。最近、加藤ら²⁷⁾、立花ら⁵⁹⁾はヨーネ病汚染和牛群を対象に清浄化対策実施の経済評価について報告している。これによれば患畜とは決定できないが感染の危険度の大きい不顕性感染牛(ハイリスク牛)の自主淘汰措置に関わる費用と同措置を実施しなかった場合の新規患畜発生による防疫経費(効果)とをシミュレーションし、費用：効果比は1：1.09、すなわち効果が費用を上回ることから自主淘汰委防疫措置の有益性を強調している⁵⁹⁾。注目すべきは効果が費用を上回るのは7年後としており、これは生産者に衛生管理計画を説明する上で大変意味のある清浄化目標値となる。

(4) 製品の市場価値への危害評価

ヨーネ病は人獣共通感染症ではないが、汚染群ではバルク乳への生菌混入の危険性があり⁴²⁾乳肉衛生や環境衛生にも充分配慮する必要がある³³⁾(表1)。実際、1991～93年に英国で行われた312検体の市販牛乳のヨーネ菌汚染調査では22検体がヨーネ菌に特異なIS900のPCRが陽性を示し、その9検体からヨーネ菌が分離された³⁸⁾。これを重大視した英国食品衛生局は、乳製品の加熱殺菌条件の改善勧告を行った。このようなヨーネ菌の汚染報告とそれに伴う行政措置が製品の消費動向や市場価格に与

える影響評価も疫学研究の重要課題となる。英国に比べてはるかに厳重な加熱条件を採用しているわが国では、乳製品中にヨーネ菌が生残する危険は殆どないとみてよいが^{31,53,75)}、ヨーネ病の農場での発生は出荷生乳の安全性にマイナスのイメージを与え、ひいては原乳の買とり価格の低下をもたらしかねない。

(5) 人や野生動物への危害性評価

海外では人のクローン病とヨーネ菌の関連についての論議が公衆衛生上の問題としてとりあげられており³²⁾、ヨーネ病を家畜衛生だけの問題として看過することはできなくなってきた⁶⁴⁾。ただし、わが国での最近の二つの大学医学部での研究は、クローン病患者とヨーネ菌の関連を細菌学的に完全に否定している^{7,29)}。当然、ヨーネ病発生農場の堆肥の農場外への搬出と肥料としての利用に

表1-a 乳汁中排菌によるバルク乳中のヨーネ菌汚染度推定値

病態	各病態群の割合(C)	乳汁菌陽性率(P)	乳汁菌数(a)	乳生産率(v)	c×p×a×v(cfu/l)
健康	0.4	0	0	1	0
非発病	0.5	9/77	100	0.95	5.6
発病	0.1	9/26	10,000	0.8	276.9

表1-b 糞便汚染によるバルク乳中のヨーネ菌汚染度推定値

病態	各病態群の割合(C)	排菌率(P)	乳汁中汚染菌数cfu/l*(a)	乳生産率(v)	c×p×a×v(cfu/l)
健康	0.4	0	0	1	0
非発病	0.5	1	0.2	0.95	0.1
発病	0.1	1	3,200	0.8	256.1

*搾乳時に乳汁1ℓに対し糞便10mgの汚染を仮定

表1 10%の発病牛、50%の非発病感染牛及び40%の非感染健康牛を含む乳牛群で生産されたバルク乳中へのヨーネ菌混入のシュミレーションモデル。a) 血行性乳汁移行菌による混入推定値、b) 搾乳過程での糞便汚染による混入推定値。a) 及びb)の合計は539cfu/l(0.5cfu/ml)となる。表1-a中の非発病牛及び発病牛の乳汁菌陽性率は、野外症例の乳汁からのヨーネ菌分離率の報告成績^{106,113)}による。発病牛、非発病牛の乳生産率は、既報告例からそれぞれ20%、5%減少と推定した。10⁵cfu/mlの菌濃度でも、適正な乳製品加熱処理装置においては65℃/15秒の加熱処理で完全死滅にいたる。わが国の全乳製品は72℃/15秒以上の加熱処理が施されている。

は残存菌への配慮が必要であり、さらに牧場周辺の土壌や河川水汚染にも留意する必要がある。

最近、英国では牧場生息の野ウサギ、キツネ、テン、アナグマ、イタチ、ノネズミ、カラスでのヨーネ菌保菌例が摘発され^{2,16)}、ヨーネ病が野生動物の健康を脅かすとともに、野生動物が家畜への伝搬源あるいは拡散源となりうる事が指摘されている。蛇足ながら、最近、英国では牛の結核（ブーノーシス病原体の*Mycobacterium bovis*が原因）の年間発生数が5,000頭を越える危機的状況にあるが、それが牧場に生息するアナグマの高い牛結核菌感染率と密接に関連しているという。このような事態に対し、英国は牛結核に対する旧来の診断・摘発・淘汰による防疫戦略から野生動物をも対象としたDNAワクチンや生ワクチンを利用した予防戦略へと転換をはかりつつある。ヨーネ病についても家畜と野生動物用の次世代ワクチンの開発研究が検討されている。

おわりに

今後の畜産物の国際競争力は食味、価格に加えて、病原体フリーを保証する安全性こそが決定的商品価値となるにちがいない。ヨーネ菌はウシ結核菌や出血性大腸菌O157のように人の健康を脅かす病原体ではないが、乳肉製品の安全性・信頼性にマイナスイメージを与える。従ってヨーネ病の清浄化はわが国の酪農・肉牛産業が国際市場で生き残るための重要課題となる。家畜の感染症の問題を生産性向上だけでなく農場経営と社会環境との調和、そして消費者の安全性指向を考慮しながら対応してゆくためには、診断・予防技術の高度化は無論であるがリスクアナリシスをもとにした疫学的視点からの取り組みが不可欠であろう。幸いにして、平成13年度から著者の所属する動物衛生研究所には疫学研究部が新設され、ヨーネ病の疫学的研究を研究課題としてとりあげている。

最後に、本学会誌に疫学的視点からのヨーネ病防疫論の掲載の機会を与えてくださった編集委員の皆様ならびに御助言いただいた当所疫学研究部の山根博士に感謝します。

引用文献

- 1) 渥美悦子ら：ヨーネ病発生牧場の清浄化への取り組み、獣医畜産新報, **44**, 27-30, 1991
- 2) Beard, P. M., et al. : Evidence of paratuberculosis in fox (*Vulpes vulpes*) and stoat (*Mustela erminea*). Vet. Rec., **145**, 612-613, 1999
- 3) Beard, P. M., et al. : Paratuberculosis infection of nonruminant wildlife in Scotland, J. Clin. Microbiol., **39**, 1517-1521, 2001
- 4) Bech-Nielsen, S., et al. : Diagnostic accuracy of a *Mycobacterium phlei*-absorbed serum enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of bovine paratuberculosis in dairy cows, J. Clin. Microbiol., **30**, 613-618, 1992
- 5) Billman-Jacobs, H., et al. : A comparison of the interferon gamma assay with the absorbed ELISA for the diagnosis of Johne's disease in cattle, Aust. Vet. J., **69**, 25-28, 1992
- 6) Cetinkaya, B. et al. : An abattoir-based study of the prevalence of subclinical Johne's disease in adult cattle in south west England, Epidemiol. Infect., **116**, 373-379, 1996
- 7) Chiba, M., et al. : No *Mycobacterium paratuberculosis* detected in intestinal tissue, including Peyer's patches and lymph follicles of Crohn's disease, J. Gastroenterol., **33**, 482-487, 1998
- 8) Collins, M. T. and Morgan, I. R. : Epidemiological model of paratuberculosis in dairy cattle, Prev. Vet. Med., **11**, 131-146, 1991
- 9) Collins, M. T., et al. : Accuracy and economics of the USDA-licensed enzyme-linked immunosorbent assay for bovine paratuberculosis, J. A. V. M. A., **203**, 1456-1463, 1993
- 10) Collins, M. T. and Morgan, I. R. : Simulation model of paratuberculosis control in a dairy herd, Prev. Vet. Med., **14**, 21-32, 1992
- 11) Collins, M. T., et al. : Herd prevalence and geographic distribution of, and risk factors for bovine paratuberculosis in Wisconsin. J. A. V. M. A., **204**, 636-641, 1994
- 12) Eamens, G. D., et al. : Comparative sensitivity of various faecal culture methods and ELISA in dairy cattle herds with endemic Johne's disease. Vet. Microbiol., **77**, 357-367, 2000
- 13) 衛藤真理子ら：牛糞便から直接PCR法によるヨーネ菌遺伝子検出法の検討、12年度家畜防疫官会議（動物検疫所研究報告）
- 14) 藤森則男：最近の牛のヨーネ病について、家畜診療, **48**, 25-33, 2001
- 15) Goodger, W. J., et al. : Epidemiologic study of on-farm management practices associated with prevalence of *Mycobacterium paratuberculosis* infection in dairy cattle, J. A. V. M. A., **208**, 1877-1881, 1996
- 16) Greig, A., et al. : Epidemiological study of paratuberculosis in wild rabbits in Scotland, J. Clin. Microbiol.,

- 37, 1736-1751, 1999
- 17) 樋口良平ら：臨床症状を示さないヨーネ病の初発例，家畜診療，**360**，19-23，1993
- 18) 明 秀一ら：石川県における乳牛のヨーネ病の初発例，家畜診療，**360**，19-23，1993
- 19) Johnson-Ifeorlundu, Y. J., et al. : Management-related risk factors for *Mycobacterium paratuberculosis* infection in Michigan, USA, dairy herds, Prev. Vet. Med., **37**, 41-54, 1998
- 20) Johnson-Ifeorlundu, Y. J., et al. : Herd-level economic analysis of the impact of paratuberculosis on dairy herds, J. A. V. M. A., **214**, 822-825, 1999
- 21) Johnson-Ifeorlundu, Y. J., et al. : The effect of subclinical *Mycobacterium paratuberculosis* infection on days open in Michigan, USA, dairy cows. Prev. Vet. Med., **46**, 171-181, 2000
- 22) Jubb, T. and Galvin, J. : Herd testing to control bovine Johne's disease, Vet. Microbiol., **77**, 423-428, 2000
- 23) Kalis, C. H. : Factors influencing the isolation of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from bovine fecal samples. J. Vet. Diagn. Invest., **11**, 345-351, 1999
- 24) Kalis, C. H., et al. : Culture of strategically pooled bovine fecal samples as a method to screen herds for paratuberculosis, J. Vet. Diagn. Invest., **12**, 547-551, 2000
- 25) 鎌田昌子ら：米国産種牛のヨーネ病による汚染状況と動物検疫状況の比較，平成11年度動物検疫調査報告，148-153
- 26) 鎌田晶子：アメリカ，オランダおよびフランスのヨーネ病汚染状況とコントロールプログラム，家畜衛生研究会報，**26**，57-64，2000
- 27) 加藤一典ら：地域ぐるみで推進したヨーネ病清浄化対策，畜産の研究，**51**，692-696，1997
- 28) 加藤信正ら：ヨーネ病に対する衛生対策—消毒薬および加熱の効果と汚染牛舎の衛生管理，臨床獣医，**7**，53-58，1989
- 29) Kanazawa, K., et al. : Absence of *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in intestinal tissues from Crohn's disease by nested polymerase chain reaction, J. Gastroenterol., **34**, 200-206, 1999
- 30) Kennedy, D. J., et al. : Progress in national control and assurance programs for bovine Johne's disease in Australia. Vet. Microbiol., **77**, 443-451, 2000
- 31) Keswani, J. and Frank, J. F. : Thermal inactivation of *Mycobacterium paratuberculosis* in milk. J Food Prot., **61**(8), 974-978, 1998
- 32) Kobayashi, K., et al. : Immunohistochemical examination for Mycobacteria in intestinal tissues from patients with Crohn's disease, Gastroenterology, **6**, 1009-1015, 1989
- 33) Koenig, G. J., et al. : Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from mononuclear cells in tissues, blood, and mammary glands of cows with advanced paratuberculosis. Am. J. Vet. Res., **54**(9), 1441-1445, 1993
- 34) 小谷貴彦：乳用牛群におけるヨーネ病浸潤シミュレーション，獣医疫学雑誌，**4**，39-46，2000
- 35) 工藤一磨ら：乾燥糞便内ヨーネ菌に対する市販消毒薬の効果，臨床獣医，**19**，35-39，2001
- 36) 丸谷敏博ら：畜産の研究，**47**，55-58，1993
- 37) Meylan, M., et al. : Survival of *Mycobacterium paratuberculosis* and preservation of immunoglobulin G in bovine colostrum under experimental condition, Aust. J. Vet. Res., **37**, 1580-1585, 1996
- 38) Millar, D., et al. : IS900 PCR to detect *Mycobacterium paratuberculosis* in retail supplies of whole pasteurized cow's milk in England and Wales, Appl. Environ. Microbiol., **62**, 346-345, 1996
- 39) Milner, A. R., et al. : The sensitivity and specificity of a modified ELISA for the diagnosis of Johne's disease from field trial in cattle, Vet. Microbiol., **25**, 193-198, 1990
- 40) 森 康行：細菌学からみたヨーネ病の新知見と診断法の進歩，臨床獣医，**19**，13-26，2001
- 41) 中西 径ら：酵素免疫測定法による乳用牛のヨーネ病診断事例，臨床獣医，**14**，35-40，1996
- 42) Nauta, M. J., et al. : Human exposure to *Mycobacterium paratuberculosis* via pasturized milk : A modelling approach, Vet. Rec., **143**, 293-296, 1998
- 43) 野田純一ら：一農場で多発したヨーネ病，12年度静岡県家畜保健衛生所業績発表会集録
- 44) 大谷利之ら：牛ヨーネ病診断におけるPCR法の応用，平成9年度静岡県家畜保健衛生所業績発表会集録
- 45) 大木美奈ら：液体培地を用いたヨーネ菌遺伝子の早期検出法，臨床獣医，**19**，40-44，2001
- 46) Ott, S. L., et al. : Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. Prev. Vet. Med., **11**, 79-92, 1999
- 47) Obasanjo, I. O., et al. : Farm factors associated with the presence of *Mycobacterium paratuberculosis*

- infection in dairy herds on the New York State Paratuberculosis Control Program. *Prev. Vet. Med.*, **32**, 243-251, 1997
- 48) Pavlik, I., et al. : Parallel faecal and organ *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* culture of different productivity types of cattle, *Vet. Microbiol.*, **77**, 309-324, 2000
- 49) 坂本芳行ら : ヨーネ病患者の疫学的分析と撲滅への課題, 畜産の研究, **54**, 498-500, 2000
- 50) 菅原健ら : 肉用牛繁殖牧場におけるヨーネ病清浄化対策, 12年度青森県家畜保健衛生所業績発表会集録
- 51) Socket, D. C., et al. : Evaluation of conventional and radiometric fecal culture and a commercial DNA probe for diagnosis of *Mycobacterium paratuberculosis* infections in cattle, *Can. J. Vet. Res.*, **56**, 148-153, 1992
- 52) Sockett, D. C., et al. : A repository of specimens for comparison of diagnostic test in procedures for bovine paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **4**, 188-191, 1992
- 53) Stabel, J. R., et al. : Heat inactivation of a *Mycobacterium paratuberculosis* in raw milk : Are current pasteurization conditions effective ? , *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 4975-4977, 1997
- 54) Stabel, J. R. : Production of gamma-interferon by peripheral blood mononuclear cells ; An important diagnostic tool for detection of subclinical paratuberculosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, **8**, 345-350, 1996
- 55) Streeter, R. N., et al. : Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows, *Am. J. Vet. Res.*, **56**, 1322-1324, 1995
- 56) Sweeney, R. W., et al. : Evaluation of a commercial enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of paratuberculosis in dairy cattle, *J. Vet. Diagn. Invest.*, **7**, 488-493, 1995
- 57) Sweeney, R. W., et al. : *Mycobacterium paratuberculosis* cultured from milk and supramammary lymph nodes of infected asymptomatic cows, *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 166-171, 1992
- 58) 高橋 修ら : ヨーネ病による経済的損害—肉牛群の集団発生例での評価, 臨床獣医, **7**, 59-64, 1989
- 59) 立花智ら : 黒毛和種のヨーネ病清浄化事例の経済評価, 平成11年度北海道家畜保健衛生所業績発表会集録
- 60) 高橋真紀 : ヨーネ病不顕性感染牛における回盲部病変の病理組織学的及びパラフィン切片を材料としたPCRによるヨーネ菌の検出, 10年度岩手県家畜衛生年報
- 61) 田村貴ら : ELISA法等で摘発された牛ヨーネ病における病変の比較, 家畜衛生の進歩, 平成10年度全国家畜保健衛生業績抄録, 動物用生物学的製剤協会刊
- 62) Taylor, T. K., et al. : Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from the milk of a cow with Johne's disease, *Vet. Rec.*, **12**, 532-533, 1981
- 63) Thorn, J. G. et al. : Estimated prevalence of paratuberculosis in Missouri USA cattle, *Prev. Vet. Med.*, **31**, 51-57, 1997
- 64) Van Kruiningen, H. J. : Lack of support for a common etiology in Johne's disease of animals and Crohn's disease in humans, *Inflamm. Bowel Dis.*, **5**, 183-191, 1999
- 65) Whitlock R. H., et al. : ELISA and fecal culture for paratuberculosis (Johne's disease): sensitivity and specificity of each method. *Vet. Microbiol.*, **20**, 387-398, 2000
- 66) Wilson, D. J., et al. : Association of *Mycobacterium paratuberculosis* infection with reduced mastitis, but with decreased milk production and increased cull rate in clinically normal dairy cows. : *Am. J. Vet. Res.*, **54**, 1851-1857, 1993
- 67) Wraight, M. D., et al. : Compliance of Victorian dairy farmers with current calf rearing recommendations for control of Johne's disease, *Vet. Microbiol.*, **77**, 429-442, 2000
- 68) 山本章子ら : 牛ヨーネ病集団発生におけるオールアウト例, 平成10年度北海道家畜保健衛生所業績発表会集録
- 69) Yokomizo Y., et al. : Antibody produced in a naturally infected with Johne's disease, *Nat. Inst. Anim. Health. Quart.*, **10**, 137-142, 1970
- 70) Yokomizo Y., et al. : A method for avoiding false-positive reactions in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the diagnosis of bovine paratuberculosis, *Jap. J. Vet. Sci.*, **47**, 111-119, 1985
- 71) Yokomizo, Y., et al. : Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay in comparison with complement fixation test for the diagnosis of subclinical paratuberculosis in cattle. *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 577-584, 1991
- 72) Yokomizo, Y., et al. : Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using *Mycobacterium*

- phlei*-absorbed serum for the diagnosis of bovine paratuberculosis in a field study, JARQ, **20**, 60-67, 1986
- 73) 横溝祐一：ヨーネ病：とくにヨーネ病の新しい分離培養法の紹介と診断価値について，家衛試年報，**24**，102-107，1982
- 74) 横溝祐一：ヨーネ病診断用ELISAキットの開発，農林水産省家畜衛生試験場；家畜衛生試験場成果情報，**4**
- 75) 横溝祐一：牛ヨーネ病に関する最新知見と防疫戦略，山口獣医学雑誌，**26**，1-26，1999
- 76) 横溝祐一：ヨーネ病の発生状況と防疫のすすめ方，臨床獣医，**19**，18-26，2001