

—日本で使用されている動物用診断薬 (Ⅶ)— 牛感染症とその診断薬の概説

3 結 核 病

木島まゆみ[†] (農林水産省動物医薬品検査所)

1 牛の結核病の概要

牛の結核病は、牛型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) によって引き起こされる慢性の呼吸器疾患である [1, 2]。また、人型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) についても、牛からの分離報告 [3-5] があることから、牛に対する病原性は低いとされている [3] もの、牛の結核病を摘発する際に併せて注意すべき病原体である。両菌とも結核菌群 (*M. tuberculosis complex*) に属し、塩基配列の相同性が99.9%以上と極めて高く、ツベルクリン反応においても交差反応を示す [2, 6]。牛型結核菌は、他の結核菌群の菌に比べて宿主域が広く、非殺菌乳の飲食等を通じて人に感染することから、人獣共通感染症起因菌としても重要である [2, 7]。

結核病は、家畜伝染病予防法第5条に基づく「監視伝染病の発生状況等を把握するための検査」(いわゆる5条検査)の対象とされている。非清浄地域において飼育されている搾乳牛、種雄牛及びそれらとの同居牛の他、都道府県知事が必要と認めた牛については、少なくとも5年ごとに感染の有無を検査することが義務付けられており、陽性牛については殺処分することとされている。ワクチン及び治療薬はない。国内における発生は、1960年代中頃まで年間1,000頭程度認められていたものの、2000年以降、年間数頭程度にまで減少し、2011年以降の発生はない [8]。

一方、海外においては、アフリカ、アジア、ラテンアメリカを始め、未だに多くの国で牛の結核病が報告され

ている [2, 9]。また、米国、英国、ニュージーランド等の国々においては、野生動物を介した牛への感染が大きな問題となっている [2, 9, 10]。

2 診断方法

牛の結核病の診断は、家畜伝染病予防法施行規則の別表第一に従い、ツベルクリン検査を主体として行う。汚染地域からの牛の導入、結核病感染牛との同居の有無といった疫学調査や剖検・細菌学的検査等(肺、胸腔内リンパ節における結核結節、病変部の抗酸菌染色、PCR等)の成績についても診断の際の根拠とする [1, 11]。

法的患者となるのは、①ツベルクリン反応が陽性のもの、②それ以外の検査により、明らかに結核菌に感染していると診断できるもの、③疑似患者の再検査でツベルクリンの疑反応が2回続いたものである。

3 診断薬の概要

(1) 診断薬の原理等

現在、わが国で市販されているツベルクリンは表の1製剤のみである。ツベルクリン接種局所における遅延型アレルギー反応(腫脹、硬結等)の程度を測定することにより結核病を診断するものである。

(2) 診断薬の製法

動物用のツベルクリンは、牛型結核菌牛10株及び人型結核菌青山B株を製造用株とする。いずれの株も病原性が強いいため、培養の際には特殊な設備と注意が必要で

表 牛の結核病の診断薬

商品名	製造販売業者	使用目的	主成分	承認年月日
ツベルクリン	勸化学及血清療法研究所	動物*の結核病の診断	牛型結核菌牛10株由来ツベルクリン及び人型結核菌青山B株由来ツベルクリン	昭和43年9月7日

*用法・用量が規定されている対象動物は、牛、山羊及び豚である。

[†] 連絡責任者：木島まゆみ (農林水産省動物医薬品検査所検査第一部)

〒185-8511 国分寺市戸倉1-15-1 ☎042-321-1841 FAX 042-321-1769
E-mail : kijima@nval.maff.go.jp

あり、また、遅発育性のため、製造には半年以上の期間を要する。

製造の際には、種菌を37℃で約4週間ごとに3回増殖培養させ、培地表面に発育した菌膜を製造用培地に移植し、約8週間培養して表面に厚い菌膜を形成させる。これを100℃で3時間加熱滅菌した後、培養ろ液を濃縮し、100℃で15分間加熱後、濃度調整し、フェノールを添加する。その後、8週間以上低温で保存して熟成させた後、ろ過滅菌し、両株由来のろ液を混合して力価を調整する [12]。

動物用ツベルクリンは、感染牛の摘発淘汰に用いられることから、その力価は、動物用標準ツベルクリン及びその基となるWHOの国際標準品に対する相対力価として、感作モルモットを用いた平行線検定法により厳密に調整されている [13]。

(3) 診断薬の使用法

ツベルクリンは牛、山羊及び豚を対象動物とするが、ここでは、牛の使用法について記載する。

通常用いられる皮内注射法では、ツベルクリン原液0.1mlを尾根部皺壁の皮内に注射する。注射後72時間目と注射前の注射部位の皮膚の厚さの差（腫脹の差）及び硬結の有無により陽性・陰性を判定する。すなわち、腫脹の差が5mm以上で硬結を伴うものが陽性、腫脹の差が3mm以下で硬結を伴わないものが陰性となる。このどちらにも入らなかったものを疑陽性とし、14日以上の間隔をおいて再検査を行う。なお、診断薬の承認事項ではないものの、家畜伝染病予防法施行規則において再検査の間隔は60日以内と定められているので、再検査は14日から60日の間に実施することとなる。

また、皮下注射法として発熱の程度及び持続性から判定することも可能である。

4 そ の 他

日本においてはほとんどの人がBCG接種を受けており、ツベルクリン反応が陽性となっていることから、牛の検査を実施する際にはツベルクリンが目や手に付かない様に注意する必要がある。

参 考 文 献

- [1] 後藤義孝：牛の結核病，動物の感染症，明石博臣他編，第3版，113-114，近代出版，東京（2011）
- [2] 鈴木定彦，松葉隆司，中島千絵：人獣共通感染症としての結核，Kekkaku, 85, 79-86（2010）
- [3] Whelan AO, Coad M, Cockle PJ, Hewinson G, Vordermeier M, Gordon SV : Revisiting host preference in the *Mycobacterium tuberculosis* complex: experimental infection shows *M. tuberculosis* H37Rv to be avirulent in cattle, PLoS One, 5, e8527（2010）
- [4] Srivastava K, Chauhan DS, Gupta P, et al: Isolation of *Mycobacterium bovis* and *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north India-possible relevance in human health, Indian J Med Res, 128, 26-31（2008）
- [5] Jia K, Yu M, Zhang GH, Zhang J, Lin ZX, Luo CB, Yu HQ, Li SJ : Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* from clinical species using DNA microarrays, J Vet Diagn Invest, 24, 156-160（2012）
- [6] Waters WR, Palmer MV, Thacker TC, Davis WC, Sreevatsan S, Coussens P, Meade KG, Hope JC, Estes DM : Tuberculosis immunity: opportunities from studies with cattle, Review, Clin Dev Immunol, 2011, 768542（2011）
- [7] Thoen C, Lobue P, de Kantor I : The importance of *Mycobacterium bovis* as a zoonosis, Review, Vet Microbiol, 112, 339-345（2006）
- [8] 農林水産省：監視伝染病の発生状況（農林水産省HP http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html）
- [9] World Animal Health Information Database (WAHID) Interface (OIE home page; http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Wahidhome/Home)
- [10] Humblet MF, Boschirolu ML, Saegerman C : Classification of worldwide bovine tuberculosis risk factors in cattle: a stratified approach, Vet Res, 40, 50（2009）
- [11] 農林水産省消費・安全局：病性鑑定指針（平成20年6月2日付け20消安第880号消費安全局長通知）40-41
- [12] 動物医薬品検査所：動物用生物学的製剤基準 診断液の部 ツベルクリン（動物医薬品検査所HP <http://www.maff.go.jp/nval/kijyun/index.html>）
- [13] 高橋敏雄，新田早人，守岡綾子，山本欣也：動物用標準ツベルクリンの評定と更新，動物医薬品検査所年報，43, 53-55（2007）

4 ブルセラ病

永井英貴[†]（農林水産省動物医薬品検査所）

1 ブルセラ病の概要

ブルセラ病は、*Brucella* 属の菌による人獣共通感染症の一つである。*Brucella* 属菌は、グラム陰性、偏性好気性、通性細胞内寄生性の短小桿菌であり、その菌種と宿主の間には一定の関係がある。*B. melitensis* はめん羊、山羊、*B. abortus* は牛、*B. suis* は豚、*B. ovis* はめん羊及び *B. canis* は犬を宿主とするが、他の家畜、動物等にも感染する。

牛、めん羊、山羊、豚、水牛、鹿及びイノシシのブルセラ病は、家畜伝染病予防法（以下「家伝法」という。）で規定する家畜伝染病であり、また、人のブルセラ症は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律で規定する四類感染症である。

本稿においては、家畜伝染病であるブルセラ病の診断薬について解説する（犬ブルセラ病の診断薬については、本誌2013年（平成25年）9月号で既報）。

本病は、世界中で広く発生しており、特に中東、地中海地域、サハラ以南のアフリカ、中国、インド、ペルー及びメキシコにおいては、高い発生率で認められている。また、近年、中央及び西南アジアの国々で、患者が非常に増加している [1]。

わが国における発生状況は、牛において1946年（昭和21年）から1972年（昭和47年）まで多発していたが、摘発・淘汰を徹底した結果、1973年（昭和48年）以降は年間数例の散発にとどまっている。過去10年間の発生状況も5戸5頭のみであり、現時点では2010年（平成22年）12月の佐賀県における発生が最後である。また、豚における発生は1940年（昭和15年）が最後で、山羊においても1949年（昭和24年）に1頭摘発されたのみであり、めん羊の発生は未だかつて報告されていない [2]。

患者において明らかな臨床所見が認められることは少なく、症状で診断することは極めて困難である。雌牛では流産が主体で、雄牛では精巣炎による不妊も認められるが、妊娠していない雌や性成熟前の雄は、感染しても無症状である [3]。

2 診断方法

本病は、家伝法第5条に基づき、監視伝染病の発生の状況等を把握するための検査（いわゆる「5条検査」）の対

象となっており、非清浄地域において飼育されている搾乳牛、種雄牛及びそれら同居牛の他、都道府県知事が必要と認めた牛について、少なくとも5年ごとに、家畜伝染病予防法施行規則別表第一（以下単に「別表第一」という。）に定める検査方法での検査が義務付けられている。

別表第一に、「ブルセラ病（牛の場合）」の項として定められた検査方法は、急速凝集反応法による検査、酵素免疫測定法（以下「エライザ法」という。）による検査及び補体結合反応検査の組み合わせによるものである。

別表第一においては、かつては試験管凝集反応法による検査が規定されていたが、試験管凝集反応法については、感度が低く、非特異反応が多いことが以前から指摘されており、また、OIEのManual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals [4] においても、試験管凝集反応法は国際貿易のためには不十分である旨が記載されていることから、エライザ法に基づく診断薬の開発が行われ、2010年（平成22年）に製造販売承認された。その後、平成23年2月4日付けで別表第一の「ブルセラ病（牛の場合）」の項が改正され、試験管凝集反応法が削られて、エライザ法が盛り込まれた。

次項において、急速凝集反応法、エライザ法、補体結合反応及び試験管凝集反応法のそれぞれについて解説する。

3 診断薬の概要

(1) 急速凝集反応法

ア 反応原理

ガラス平板上で菌液（抗原）と被検血清（抗体）を混ぜ、凝集反応の有無によって被検血清中の抗体の国際単位を求める方法である。

イ 承認年月日

昭和45年8月18日

ウ 製品の一覧表

表のとおり。

エ 製法の概要

本品は、菌液のみの製品である。当該菌液は、以下のとおり製造する。

製造用株（ブルセラ・メリテンシス）の培養菌液を加熱殺菌し、濃縮した後、遠心集菌する。希釈用液で濃度調整し、2～5℃で7日間以上静置し、死

[†] 連絡責任者：永井英貴（農林水産省動物医薬品検査所）

菌浮遊液とする。死菌浮遊液について参照血清を用いて平板凝集反応を行い、抗原価を調整する。

オ 使用方法の概要

ガラス板上で被検血清と診断液を混合し、被検血清の量と凝集の有無から被検血清中に含有される抗体の国際単位を求める。30 単位以上のものを陽性とする。

カ 使用上の注意等

本品の使用に当たっては、四季を通じ、20～25℃で行われるよう留意し、戸外では、直射日光やほこりのひどいところは避けなければならない。

(2) エライザ法

ア 反応原理

抗原（ブルセラ・アボルタスから抽出精製した LPS）が固相化されたマイクロストリップを用いた直接吸着法による間接エライザ法である。

イ 承認年月日

平成22年7月14日

ウ 製品の一覧表

表のとおり。

エ 製法の概要

本品は、抗原固相化マイクロストリップ、及びエライザ法に必要な試薬を組み合わせたキットである。抗原固相化マイクロストリップは、以下のとおり製造する。

製造用株（ブルセラ・アボルタス）から抽出精製した LPS をマイクロストリップの各ウェルに固相化し、保存液を加えて梱包材に脱気封入する。

オ 使用方法の概要

(ア) マイクロストリップの保存液を捨て、希釈した被検血清、指示陽性血清及び指示陰性血清を加えて反応させる。

(イ) 洗浄後、希釈した2次抗体溶液を加えて反応させる。

(ウ) 洗浄後、発色基質液を加えて反応させ、反応停止液を加えて、空気をブランクとして415nmの吸

光度を測定する。

(エ) 以下の式から%P値を求め、%P値が30以上のものを陽性とする。

%P値＝

$$\frac{\text{被検血清の吸光度} - \text{指示陰性血清の吸光度}}{\text{指示陽性血清の吸光度} - \text{指示陰性血清の吸光度}} \times 100$$

カ 使用上の注意等

本品の使用に当たっては、抗原固相化マイクロストリップ、洗浄液、各種希釈用液、発色基質液及び反応停止液を、あらかじめ20～30℃に戻しておく必要があります。この際、発色基質液は遮光しなければならない。また、抗原固相化マイクロストリップは各ウェルに保存液を添加しているため、抗原固相化マイクロストリップの裏側が保存液でぬれている場合があります。そのときはペーパータオル等で傷を付けないように拭いてから使用する必要がある。

(3) 補体結合反応

ア 反応原理

抗原と被検血清と補体を混ぜて感作させたものに、溶血素で感作した羊赤血球を加え、溶血度によって血清中の抗体を検出する。

抗原抗体複合物と補体が結合し、遊離補体が少なくなれば、溶血は起きないが、抗原と抗体が反応しないと、補体が結合せずに遊離のまま残り、溶血が起こる。すなわち、補体結合反応とは、補体が抗原抗体複合物とどれだけ結合したのかを、感作赤血球の溶血により間接的に見る反応である。

イ 承認年月日

昭和42年7月15日

ウ 製品の一覧表

表のとおり。

エ 製法の概要

本品は、抗原及び指示陽性血清（ブルセラ・メリテンシス感染牛血清を、抗体価を調整後、凍結乾燥

表 ブルセラ病の診断薬（現在流通しているもの）

診断薬の原理	商品名（一般的名称）	製造販売業者名	主成分	使用目的
急速凝集反応法	ブルセラ急速診断用菌液（ブルセラ病急速診断用菌液）	（一財）化学及血清療法研究所	ブルセラ・メリテンシス125株	ブルセラ感染牛の簡易検出のための急速凝集反応に使用する
エライザ法	牛ブルセラエライザキット	JNC(株)	ブルセラ・アボルタス99株抽出精製LPS	牛血清中のブルセラ・アボルタスに対する抗体の検出
補体結合反応	ブルセラ補体結合反应用可溶性抗原（ブルセラ病診断用補体結合反応抗原）	（独）農業・食品産業技術総合研究機構	ブルセラ・メリテンシス99株又は125株抽出可溶性抗原	ブルセラ・メリテンシスに対する補体結合抗体の検出
試験管凝集反応法	ブルセラ病診断用菌液（ブルセラ病診断用菌液）	（独）農業・食品産業技術総合研究機構	ブルセラ・メリテンシス99株又は125株加熱死菌液	ブルセラ・メリテンシスに対する試験管法による凝集抗体の検出

したもの)から成る。抗原は、以下のとおり製造する。

製造用株(ブルセラ・メリテンシス)の培養菌液を生菌のまま遠心集菌し、抽出用液を加えて22℃で14日間静置して抗原を抽出する。遠心上清を二度透析した抗原液について、参照陽性血清を用いた補体結合反応により抗原価を調整する。

オ 使用方法の概要

(ア) 2vol%羊血球液(使用者が用意したもの)と2単位の溶血素液(市販のもの)を等量混合し、感作血球液とする。

(イ) 5倍希釈し、56℃30分間非働化した被検血清、100倍希釈した抗原、及び補体(市販のもの)を混合し、4℃で一夜感作する。このとき、指示陽性血清についても5倍希釈したものを非働化し、更に2倍階段希釈して、同様に感作する

(ウ) 感作血球液を加えて反応させ、溶血阻止度を観察する。50%以上の溶血阻止が認められた場合、補体結合反応陽性とする。このとき、指示陽性血清は、ラベルに記載された抗体価を示さなければならない。

カ 使用上の注意等

本品の使用に当たっての特別な使用上の注意はないが、診断薬に係る一般的な使用上の注意に従って使用する必要がある。

(4) 試験管凝集反応法

ア 反応原理

被検血清と抗原を試験管内で反応させ、凝集の程度により血清中の抗体を検出するものである。

イ 承認年月日

昭和62年10月31日

ウ 製品の一覧表

表のとおり。

エ 製法の概要

本品は、菌液のみの製品である。当該菌液は、以

下のとおり製造する。

製造用株(ブルセラ・メリテンシス)の培養菌液を遠心集菌し、加熱殺菌後濃度調整したものを2～5℃で7日間以上静置し、死菌浮遊液とする。この死菌浮遊液について、抗原価を調整する。

オ 使用方法の概要

血清を5倍希釈から2倍階段希釈し、試験管内で10倍希釈抗原と混合し、37℃で18～24時間感作後、標準混濁管と比較して凝集の程度を観察する。

希釈倍数40倍以上において50%凝集以上を示すものを陽性とし、20倍希釈において25%凝集以下のものを陰性とする。陽性でも陰性でもないものを疑陽性とする。

カ 使用上の注意等

ブルセラ病では、血清によっては凝集阻止帯を示すものがあるので、判定に際しては注意する必要がある。また、被検血清の希釈液(0.5w/v%フェノール加生理食塩液)は、できるだけ新しいものを使用することが好ましい。

参 考 文 献

- [1] World Organization for Animal Health : Animal Disease Information Summaries (OIE home page; http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Media_Center/docs/pdf/Disease_cards/BCLS-EN.pdf)
- [2] 農林水産省：監視伝染病の発生状況(農林水産省HP http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html)
- [3] 動物衛生研究所：家畜の監視伝染病(動物衛生研究所HP http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_fact/k10.html)
- [4] World Organization for Animal Health : Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (OIE home page; <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>)