

—日本で使用されている動物用診断薬 (Ⅷ)— 牛感染症とその診断薬の概説

5 ヨーネ病

永井英貴[†] (農林水産省動物医薬品検査所)

1 ヨーネ病の概要

ヨーネ病の病原体は、抗酸菌の一種であるヨーネ菌 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*) である。ヨーネ菌は、抗酸菌の増殖に必要なマイコバクチンを合成することができないため、人工培地で増殖させるためには、マイコバクチンを添加する必要がある。また、極めて遅発育性であり、寒天培地上でコロニーを形成するまでに6週間以上を要する。

ヨーネ病は、世界中で広く発生している。わが国においては、牛、めん羊、山羊、水牛及び鹿のヨーネ病は、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る (1971年 (昭和46年) 指定)。1970年代までは輸入牛を中心に散発していたが、1980年代になって国産牛での発生が増加し、1986年 (昭和61年) には100頭を超え、1991年 (平成3年) には200頭を超えた。1997年 (平成9年) に500頭を超えて以降は、常に400頭以上で推移しており (最多は、2006年 (平成18年) の1,179頭) [1]、細菌性の家畜伝染病のうち最も被害の大きなものの一つである。ヨーネ菌に感染した牛は糞便中や乳汁中にヨーネ菌を排菌し、経口感染により感染が拡大する。

ヨーネ病は潜伏期間が極めて長い慢性疾患であり、その症状は、牛では慢性・難治性の下痢、削瘦、乳量の低下等であり、治療は行われず、感染牛は摘発・淘汰される。発病率は5~10%であり、感染牛であっても無症状で経過するものが多く認められ、これらの感染牛が長期間にわたって排菌することが、本病がまん延する原因となっている [2, 3]。

2 診断方法

本病は、家伝法第五条に基づく、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「五条検査」)

の対象となっており、発生地域における飼養牛及び導入牛について、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。

別表第一にヨーネ病の項として定められた検査方法は、以下の検査方法の組合せである。

- (1) 予備的抗体検出法 (以下「スクリーニング法」という。) による検査
- (2) リアルタイムPCR法による検査
- (3) ヨーニン検査
- (4) エライザ法による検査
- (5) 補体結合反応検査
- (6) その他の検査: 疫学的検査, 臨床検査及び細菌検査

ヨーネ病の診断法におけるゴールドスタンダードはヨーネ菌の培養検査であるが、上記のように本菌は極めて遅発育性であり培養には非常に長期間を要するため、1992年 (平成4年) に病性鑑定指針にエライザ法が追加されて以来、ヨーネ病の診断はエライザ法を中心として行われてきた (別表第一へのエライザ法の追加は、1998年 (平成10年))。

しかし、エライザ法においては原理的に非特異反応が避けられず、平成19年10月には神奈川県においてヨーネ病の疑似患畜の生乳が使用された可能性のある乳製品 (牛乳) が採血日に遡って回収・廃棄されたが、後日問題の乳牛はヨーネ病陰性であることが判明した。このようなことへの対策として2008年 (平成20年) 7月には別表第一にスクリーニング法が追加され、その後、ヨーネ菌以外の抗酸菌による非特異反応が問題となったことから、2013年 (平成25年) 4月にはリアルタイムPCR法が別表第一に追加されて、現在では、リアルタイムPCR法を中心とした診断体制が構築されている。

[†] 連絡責任者: 永井英貴 (農林水産省動物医薬品検査所)

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

表 ヨーネ病の診断薬（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	承認年月日
スクリーニング法	ヨーネスクリーニング・ブルキエ	(株)微生物化学研究所	マイコバクテリウム・アビウム亜種アビウム 18株抽出抗原	牛血清中のヨーネ菌に対する抗体の予備的検出	平成20年5月21日
	ヨーネライザ・スクリーニングKS	共立製薬(株)	マイコバクテリウム・アビウム亜種アビウム P-18-NIAH株精製抗原		平成23年1月17日
リアルタイムPCR法	ヨーネジーン・KS	共立製薬(株)	ホットスタートTaqDNAポリメラーゼ含有クオンティクト・サイバーグリーンPCR反応液	糞便中のヨーネ菌DNAの検出	平成24年12月13日
ヨーニン	ヨーニン（ヨーニン）	(独)農業・食品産業技術総合研究機構	マイコバクテリウム・アビウム亜種アビウム P-18-NIAH株加熱死菌濃縮液	ヨーニン反応によるヨーネ病の診断	昭和48年10月4日
エライザ法	ヨーネライザII	共立製薬(株)	マイコバクテリウム・アビウム亜種アビウム P-18-NIAH株精製抗原	牛血清中のヨーネ菌に対する抗体を検出する	平成15年3月11日
補体結合反応	ヨーネ病補体結合反応用抗原（ヨーネ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	マイコバクテリウム・アビウム亜種パラツベルクローシス Teps株菌体抽出リボ多糖体	ヨーネ菌に対する補体結合抗体の検出	昭和51年4月6日

なお、ヨーネ病の診断に当たって留意すべき点は、以下のとおりである。

- ①各種検査法による摘発可能な時期が限られており、どの検査法によっても摘発できない時期が存在すること。よって、現在実用化されている検査法では、感染牛の一部しか摘発できないこと。
- ②各診断薬の判定結果だけでヨーネ病の感染の有無の判定ができるわけではなく、別表第一の判定基準に基づいて、必要に応じて複数回の検査の実施、複数の検査の組合せ等により判定を行わなければならないこと。

3 診断薬の概要

(1) スクリーニング法

ア 反応原理

抗体検出であり、ヨーネ菌から抽出又は精製された抗原が固相化されたマイクロプレートを用いた間接エライザ法である。スクリーニングに用いられるものであることから、感度が高めになるように調整されている。

イ 承認年月日

表のとおり。

ウ 製品の一覧表

表のとおり。

エ 製法の概要

本品は、抗原を固相化したマイクロプレート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。

オ 使用方法の概要

- ①マイコバクテリウム・フレイ菌の抽出抗原又は可溶性たんぱくを含んだ溶液で吸取・希釈した被検

血清、指示陽性血清及び指示陰性血清をマイクロプレートのウェルに加えて反応させる。

- ②洗浄後、希釈した標識抗体溶液を加えて反応させる。
- ③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、450nmの吸光度を測定する。
- ④以下の計算式で指示陽性血清に対する相対吸光度値を求め、規定値以上のものを陽性、規定値未満のものを陰性とする。

相対吸光度値＝

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

カ 使用上の注意等

本品はあくまでもスクリーニング用のキットであり、本品において陽性であった場合には、別表第一に基づき、そのほかの検査を行って最終的な判定を行う必要がある。

(2) リアルタイムPCR法

ア 反応原理

SYBR Green I インターカラーション法を用いたリアルタイムPCRにより、ヨーネ菌遺伝子に特異的なDNAを検出する。

イ 承認年月日

表のとおり。

ウ 製品の一覧表

表のとおり。

エ 製法の概要

核酸増幅試薬（DNAポリメラーゼ及びSYBR Green I を含有する.）、プライマー、ウラシル-N-

グリコシラーゼ (UNG), リボヌクレアーゼフリー水及び指示陽性 DNA を組み合わせたキットである。

オ 使用方法の概要

- ①市販のヨーネ菌 DNA 抽出精製試薬キットを用いて、糞便からヨーネ菌 DNA を抽出、精製する。
- ②核酸増幅試薬、プライマー、UNG 及びリボヌクレアーゼフリー水を混合して反応液を調製する。
- ③反応液に、糞便抽出 DNA 又は指示陽性 DNA を添加し、リアルタイム PCR 装置を用いて既定の条件で反応させる。
- ④試験成立条件を全て満たし、反応液の蛍光強度が上昇し、かつ、解離曲線解析においてヨーネ菌指示陽性 DNA と同様な解離温度を示した検体をヨーネ菌 DNA 陽性、それ以外の検体をヨーネ菌 DNA 陰性とする。

カ 使用上の注意等

キットとしての判定は上記のとおり定性的なものであるが、別表第一においては定量的な判定を行い、指示陽性 DNA を用いた用量-反応式からヨーネ菌 DNA 陽性検体中のヨーネ菌 DNA 濃度を計算して、それが 0.001pg/2.5µl 以上のとき、ヨーネ病陽性と判定する。

(3) ヨーニン

ア 反応原理

細胞性免疫を指標とした皮内反応である。

イ 承認年月日

表のとおり。

ウ 製品の一覧表

表のとおり。

エ 製法の概要

ヨーネ菌の培養ろ液を濃縮し、フェノールを 0.5w/v% の割合になるように添加した皮内反応用抗原である。

オ 使用方法の概要

- ①牛、めん羊及び山羊の尾根部皺壁の厚みを測定した後、同部皮内に 0.1ml を注射する。
- ②注射 48～72 時間後に注射部位の皺壁の厚みを測定し、注射前の厚みとの差が 2mm 以上の場合、ヨーニン反応陽性とする。

カ 使用上の注意等

別表第一においては、ヨーニンの反応とエライザ法又は補体結合反応検査の判定結果とを合わせて総合的に判定する。また、本剤の使用に当たっては、術者等のアレルギー反応に注意する必要がある。

(4) エライザ法

ア 反応原理

抗体検出であり、ヨーネ菌から精製された抗原が

固相化されたマイクロプレートを用いた間接エライザ法である。

イ 承認年月日

表のとおり。

ウ 製品の一覧表

表のとおり。

エ 製法の概要

本品は、抗原を固相化したマイクロプレート、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。

オ 使用方法の概要

- ①マイクロプレートの保存液を捨て、マイコバクテリアウム・フレイ菌の可溶性たんぱくを含んだ溶液で吸収・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。
- ②洗浄後、希釈した標識抗体溶液を加えて反応させる。
- ③洗浄後、基質溶液を加えて反応させ、反応停止液を加えて、450nm の吸光度を測定する。
- ④以下の計算式で ELISA 値を求め、規定値以上のものを陽性、規定値未満のものを陰性とする。

ELISA 値 =

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

カ 使用上の注意等

別表第一においては、エライザ法のみでヨーネ病の診断を行うことはなく、ヨーニンの反応の判定結果と合わせて総合的に判定する。

(5) 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

表のとおり。

ウ 製品の一覧表

表のとおり。

エ 製法の概要

本品は抗原と指示陽性血清から成る。抗原は、ヨーネ菌の加熱死菌体からフェノールで抽出し、アル

コールで分画したりポ多糖体を、1ml中に800単位の抗原を含むよう0.01w/v%硫酸マグネシウム加生理食塩液で調整し、凍結乾燥して製造する。

オ 使用方法の概要

- ①5倍希釈し56℃30分間非働化した被検血清又は指示陽性血清を、160倍まで2倍階段希釈する。
- ②抗原は0.01w/v%硫酸マグネシウム加生理食塩液を加え、100℃で数分間加熱し、よく溶解し、更に希釈する。
- ③3vol%めん羊血球液（使用者が用意したもの）と3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。
- ④希釈血清、希釈抗原及び2単位の補体（市販のもの）を混合し、4℃で一夜感作する。
- ⑤37℃で5分間加熱した後、感作血球液を加えて37℃で30分間感作後、溶血阻止度により判定する。なお、判定に際しては、指示陽性血清がラベルに記載された抗体価を示さなければならない。

4 今後の課題

リアルタイムPCR法が導入されてから、ヨーネ菌感染後、診断ができるようになるまでの期間が大幅に短縮

された。また、エライザ法と比較して非特異反応がかなり少なくなったのではないかと考えられている。しかし、現在実用化されている検査法では、感染初期はヨーネ病を摘発することが困難であり、このことが本病の撲滅・清浄化を困難にしている一因となっている。細胞性免疫を指標としたサイトカイン（インターフェロン・ガンマ、インターロイキン-10等）測定法では、感染初期の診断も可能であることが報告されており [4]、今後はサイトカイン測定法を応用した診断薬の開発が望まれるところである。

参考文献

- [1] 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/pdf/h24_ruinen_kachiku_130417.pdf）
- [2] 森 康行：ヨーネ病，動物の感染症，明石博臣ら編，第3版，116-117，近代出版，東京（2011）
- [3] 社団法人日本獣医師会：ヨーネ病，家畜疾病総合情報システム，監視伝染病診断指針（畜産農家用普及版INT）（日本獣医師会HP：<http://nichiju.lin.gr.jp/tksn/illness/c12.html>）
- [4] 森 康行：ヨーネ病，医学のあゆみ，236，1131-1138（2011）

6 アナプラズマ病

平野文哉[†]（農林水産省動物医薬品検査所）

1 アナプラズマ病の概要

アナプラズマ病は、リケッチア目アナプラズマ科の *Anaplasma marginale*（以下Amとする）、*A. centrale*（以下Acとする）、*A. candaum*及び*A. ovis*によって引き起こされる感染症である。わが国では、沖縄県にAmの分布が確認されており、本州の各県においてAcの分布が確認されている [1]。このうち、Amについては、家畜伝染病予防法において牛が、家畜伝染病予防法施行令によって水牛及び鹿がそれぞれ本病の対象動物とされており、国内において、AmとAcについての鑑別診断が非常に重要なものとなっている。

Amは熱帯、亜熱帯地域に分布するオウシマダニ等のマダニの吸血により媒介されるだけでなく、アブ、サシバエ及びカによる機械的伝播も成立する。感染すると、2～5週間の潜伏期を経て発熱、貧血、黄疸を起こす。

若齢牛に比べて2歳以上の成牛において症状が強く、急性経過の場合は死亡する。耐過した牛においても、完全に体内から消失するわけではないと考えられている [2]。記憶に新しいところでは、平成19年及び20年に沖縄県の牛2頭での患畜が確認され [3]、平成22年にはオーストラリアからの輸入乳用繁殖用牛1頭において、アナプラズマ病の疑似患畜が確認されている [4]。

2 診断方法

診断方法には、一般的に血液（塗末）検査、補体結合（CF）反応 [5]、競合ELISA法、カード凝集反応及び遺伝子学的診断法（nested-PCR及びリアルタイムPCR） [6]がある。

わが国におけるアナプラズマ病の診断は、まず疫学調査、臨床検査、血液検査、剖検を行い、その後血液検査

[†] 連絡責任者：平野文哉（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 : humiya_hirano@nval.maff.go.jp

表 アナプラズマ病診断薬

商品名	製造販売業者	効能・効果	主成分	承認年月日
アナプラズマCF抗原 “化血研”	(一財)化学及血清療法研究所	アナプラズマ・マージ ナレ感染症の診断	アナプラズマ・マージナレ 東風平株CF抗原	平成5年 5月7日

で重度の寄生（概ね1%以上の寄生）がみられる症例に関しては、スコア採点法によりAmとAcの鑑別を行う。血液検査において、擬陽性から陰性の症例に関しては、病理組織学的検査を行い、血清学的検査により、AmとAcの鑑別診断を行う [5]。

血清学的検査は、以下で説明するアナプラズマ病診断用補体結合（CF）反応抗原を用いCF反応による抗体の検出を行う。現在、わが国で市販されている商品は1製剤である（表参照）。

3 診断薬の概要

(1) 診断薬の原理

補体結合反応を原理とする。

(2) 診断薬の製法

本製剤は、液状抗原、指示陽性血清及び指示陰性血清から構成されている。液状抗原はAm東風平株感染牛の血液を高圧窒素ガス破碎により溶血させ採取したAm小体を、超音波処理した後、保存剤を加え調整したものである。指示陽性血清は、Am人工感染牛から得られた血清を、CF反応抗体価80～160倍に調整した後、凍結乾燥したものである。また、指示陰性血清は、Amに対するCF抗体価陰性（5倍未満）の健康な牛から得られた血清を凍結乾燥したものである。

(3) 診断薬の使用法

あらかじめ補体と溶血素の検定を2vol%羊赤血球浮遊液で行い、それぞれ2単位を本試験に使用する。CF反応を行うにあたって、被検血清、指示血清及び抗原液の調整を以下のように行う。まず、被検血清をゼラチン・ペロナール緩衝食塩液（以下、希釈液とする）で5倍に希釈したものを、56℃30分間非働化する。次に、指示血清のバイアルに2.5mlの希釈液を加え、溶解後（5倍希釈血清）、56℃30分間非働化する。この時、余剰分については、非働化せず凍結保存しておく。そして、抗原液の必要量を、希釈液を用いて4倍に希釈する（2単位/0.1ml）。

CF反応の術式に関しては、添付の使用説明書を参照されたい。この時、被検血清の他、指示血清を必ず対照

として使用することを念頭に置いてもらいたい。本試験と合わせて、使用補体の力価を確認するための補体の2次検定も行う。

判定としては、肉眼で溶血阻止度を確認する。100%溶血阻止を示す血清の最高希釈倍数をCF抗体価とし、抗体価5倍以上を陽性とする。

なお、判定に際しては、指示血清が指定された力価を示さなければならない。

4 その他

わが国で薬事法の承認を得て市販されているアナプラズマ病の血清学的検査に用いる診断薬は1製剤のみである。国外においては、競合ELISAを測定原理としたキットが市販されているが、日本で承認のある製剤とは異なりAmとAcの鑑別ができないことから、国内において、診断目的での使用には適していないと考えられている [2]。

診断には、本製剤の使用説明書にも記載されているように、Ac抗体に対しても陽性（一般的には40倍又はそれ以下）を示すことがあるため、抗体価、疫学及び寄生部位などを十分考慮して判定することが必要である。

参考文献

- [1] 見上 彪：アナプラズマ科と感染症，獣医微生物学第2版，117（2003）
- [2] 動物衛生研究所：アマプラズマ病（動物衛生研究所HP：http://www.naro.affrc.go.jp/org/niah/disease_fact/k14.html）（2014）
- [3] 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）（2010）
- [4] 動物検疫所：輸入検疫時に摘発された監視伝染病，動検年報，32（2009）
- [5] 農林水産省消費・安全局：病性鑑定指針（平成10年10月22日付け10畜A第1937号農林水産省畜産局長通知）48-49（2010）
- [6] OIE：Bovine anaplasmosis, OIE Terrestrial Manual, 589-600（2012）