

## 9. ヨーネ病スクリーニングエライザの比較検討

玖珠家畜保健衛生所

○ (病鑑) 矢崎竜 廣瀬英明 佐藤邦雄 西田清実

### 【はじめに】

本県では、「大分県ヨーネ病防疫対策実施要領」により家畜伝染病予防法第5条に基づくヨーネ病の検査を2年に一回実施してと

ころである。  
 現行のヨーネ病の検査は、スクリーニング法で陽性を示した場合、再度採材を行いエライザ法により検査をすることとされており、エライザ法で陽性の場合、同じ検査を繰り返し、再度陽性の場合リアルタイムPCRにて判定することとされている（図

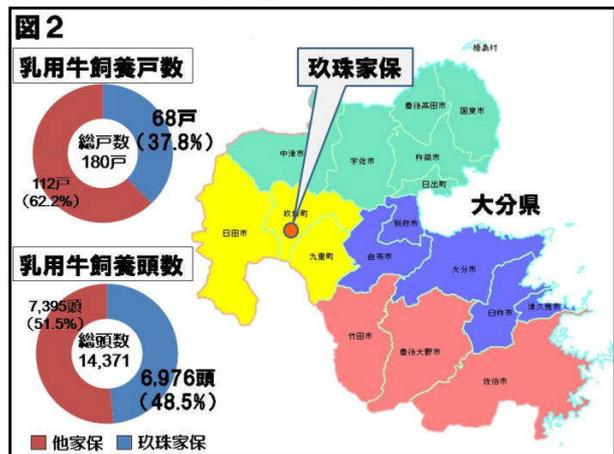
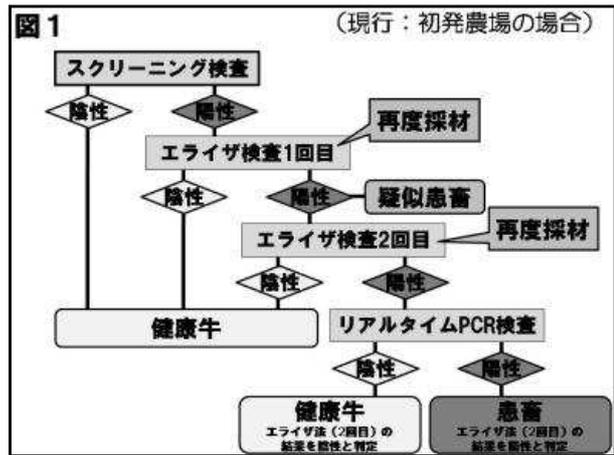
1）。

このエライザ検査は、乳用牛の場合、朝の搾乳後に採血を実施し、夕方の搾乳までの間に結果を出す必要があることから、時間的制約を科せられた状態で各農場での採材や検査を実施しなくてはならず、多大な時間と労力を割かれている状態にある。

玖珠家畜保健衛生所は、県西部に位置し、乳用牛飼養戸数は、68戸と全体の約38%、飼養頭数は約7,000頭と全体の約50%を占め、ヨーネ病の検査は年間3,000～4,000頭実施しており、業務の中でのヨーネ病の検査の占める割合も非常に大きなものとなっている（図2）。乳用牛飼養農場は管内に広く分布しており、片道1時間以上かかる農場も多いため、ヨーネ病スクリーニング法で多数の陽性が出た場合、朝の搾乳から

夕方の搾乳までの間に採材と検査を完了させることに非常に苦慮しているのが現状である。

現在、プルキエ及びKSの2種類の牛ヨーネ病スクリーニング用エライザキットが市販されているが、基本的なエライザの手順は、両キットとも同様で、ヨーネ菌の抗原を貼り付けたプレートにマイコバクテリウム・フレイ菌抽出抗原で抗酸菌に対する抗体を吸収後、感作させ、ペルオキシダーゼ標識抗牛IgG1抗体と発色基質であるテトラメチルベンチジンで発色させその発色度合いにより判定する事となっている。両キットの相違点は、主に、血清希釈倍率がプルキエでは20倍、KSでは50倍となっていることと、吸収剤の菌株の種類が



異なっていることである（表1）。

平成23年度まではヨーネ病スクリーニングにヨネスクリーニング・プルキエ（以下プルキエ）を使用しており、平成22年度は、3,596検体実施し、2.1%の74検体が陽性となり、エライザ法ですべて陰性が確認された。また、平成23年度は1,482検体実施し、3%の45検体が陽性となり、エライザ法により2頭の患畜を摘発した。平成24年度からは、新たに発売されたヨーネ病スクリーニングキットであるヨネライザ・スクリーニングKS（以下KS）を試験的に使用することとし、現在までに、2,409検体実施し0.3%の7検体のみが陽性となり、エライザ法により1頭の患畜を摘発した（表2）。この2種類のキットについての予備情報はなく、結果としてKSを使用した方が陽性率が低く、両キットの特異性に差があることが示唆された。

これまで、この2種類のキットの結果を比較をした報告は少なく、どちらのキットを選択すればよいかという情報が不足していることから、今回、当所におけるスクリーニング法の実施にあたって、この2種類のキットを用いその結果について比較検討したので報告する。

### 【材料と方法】

平成23年度にプルキエで陽性となった45検体についてKSを用いて抗体測定を実施した。また、その結果、大幅に陽性数が減少したことから、マイコバクテリウム・フレイ菌抽出抗原で血清処理する過程に陽性数の差の要因があると考え、両キットの血清希釈液を入れ替えて同様に抗体測定を実施した。

また、平成24年度に実施したヨーネ病検査の検体51戸2,409検体のうち、採材が容易な珍珠家畜保健衛生所周辺農場を除いた43戸2,184検体についてプルキエおよびKSを用いて抗体測定を実施し、その結果について比較した。

### 【結果】

平成23年度にプルキエ陽性となった45検体の、KSによる抗体測定を実施した結果で、各検査値の散布図で示す（図3）。横軸がKSのエライザ値で0.3以上を陽性、縦軸がプルキエのS/P値で60以上をそれぞれ陽性と判定した。プルキエ陽性検体のうち、9検体がKSで陽性となり、陽性検体は、プルキエの20%に減少した。2頭の患畜については、両キットとも陽性値を示した。このように、通常の方法では、KSではプルキエに比較して陽性検体が大幅に減少した。

表1 ヨーネ病スクリーニングキット



	ヨネスクリーニング・プルキエ	ヨネライザ・スクリーニングKS
血清希釈	20倍希釈	50倍希釈
吸収剤	マイコバクテリウム・フレイバズツール研究所株	マイコバクテリウム・フレイ354-NIAH株
抗原	マイコバクテリウム・アビウム変種アビウム18株	マイコバクテリウム・アビウム変種アビウムP-18-NIAH株
標識抗体	ペルオキシダーゼ標識抗牛IgG1抗体	ペルオキシダーゼ標識抗牛IgG1抗体
基質	3,3',5,5'-TMB	3,3',5,5'-TMB

表2

### ヨーネ病5条検査実績

年度	戸数	検体数	スクリーニングエライザ陽性（陽性率）	患畜
H22	54戸	3,596	74 (2.1%)	0頭
H23	18戸	1,482	45 (3.0%)	2頭
H24	51戸	2,409	7※ (0.3%)	1頭
H24 (予定)	1戸	1,800	?	?

※平成24年度から、スクリーニングエライザにKSを使用

KSの血清希釈液を使用してプルキエで抗体測定を実施した結果、さらに陽性率は減少し、3検体が陽性となり、通常のプルキエの結果の6.7%に減少した。また、逆にプルキエの血清希釈液を使用してKSで抗体測定を実施したところ、陽性検体は僅かに減少し、40検体が陽性となり、通常のプルキエの結果の88.9%に減少した。全ての方法で患畜は明らかに陽性値を示した（表3）。

平成24年度のヨーネ病スクリーニング検査の成績を図4に示す。プルキエでは、2,184検体中1.7%の38検体が陽性を示し、KSでは、同じく0.3%の7検体が陽性を示した。

患畜は両キットとも明らかな陽性値を示した。

表4に両キットでの陽性検体のみの成績を示す。プルキエ陽性の38検体中、KSでも陽性を示した検体は、4検体と一致率は10.5%であった。逆に、KS陽性の7検体中、プルキエでも陽性を示した検体は、4検体で一致率は57.1%であった。

KSで陽性を示した7検体のうち3検体はプルキエ陰性であり、新たな非特異検体が出現したが、陽性率で比較するとKSが約1/5に減少した。

【考 察】

以上の結果から、2種類のヨーネ病スクリーニングキットの比較を表5にまとめた。非特異の発生は明らかにプルキエが高く陽性率で5倍以上の差があった。エライザの反応系自体は、非特異の発生率が同じであればプルキエの方が良好と思われた。検査時間は、待ち時間の合計がプルキエで100分、KSで120分とプルキエの方が短時間で結果を得られ、試薬類は両キットとも、検査ミスを減少させる目的で各試薬に着色しており、使いやすさは同等であった。また、有効期限は両キットとも製造後1年であった。金額は、平成25年度の予定価格でプルキエ

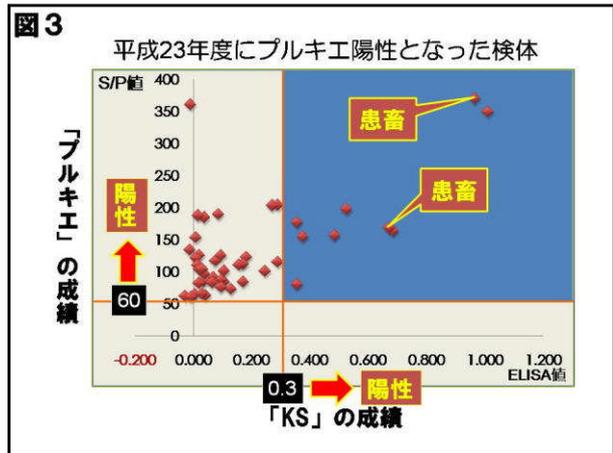


表3

検定	プルキエ 通常	KS 通常	プルキエ KS吸収	KS プルキエ吸収	備考
1	182.1	0.05	0.05	0.05	
2	152.1	0.05	-0.07	0.05	
3	369.3	-0.01	-0.12	0.13	
4	143.1	0.05	-0.05	0.05	患畜
5	182.1	0.04	0.04	0.04	
6	182.1	0.05	-0.07	0.05	
7	182.1	0.05	-0.07	0.05	
8	182.1	0.05	-0.07	0.05	
9	182.1	0.05	-0.07	0.05	
10	111.0	0.05	0.05	0.05	
11	182.1	0.05	-0.07	0.05	
12	182.1	0.05	-0.07	0.05	
13	144.1	0.05	-0.07	0.05	
14	134.2	-0.01	-0.07	0.05	
15	145.0	0.11	0.16	0.05	
16	131.2	0.05	-0.07	0.05	
17	145.0	0.05	-0.07	0.05	
18	82.5	-0.01	-0.12	0.13	
19	182.1	0.05	-0.07	0.05	
20	113.1	0.05	-0.07	0.05	
21	225.2	0.05	0.05	0.05	
22	205.1	0.07	-0.07	0.05	
23	95.1	0.04	-0.07	0.05	
24	154.4	0.05	-0.07	0.05	
25	132.2	0.10	0.12	0.05	
26	112.0	0.05	0.12	0.05	
27	179.7	0.05	0.12	0.05	
28	179.7	0.14	0.10	0.14	
29	111.7	0.17	0.13	0.13	
30	145.0	0.14	0.17	0.07	
31	182.4	0.04	0.13	0.14	
32	182.1	0.05	0.17	0.05	
33	73.1	0.05	0.05	0.05	
34	73.1	0.12	0.12	0.05	
35	111.0	0.05	0.12	0.05	
36	111.0	0.05	0.12	0.05	
37	111.0	0.05	0.12	0.05	
38	177.1	0.10	0.14	0.05	
39	182.1	0.05	-0.07	0.05	
40	182.1	0.11	0.14	0.13	患畜
41	182.1	0.10	0.14	0.13	
42	182.1	0.05	0.07	0.13	
43	182.1	0.05	-0.07	0.13	
44	182.1	0.05	-0.07	0.13	
45	182.1	0.05	0.14	0.05	
陽性数	45	9	3	40	
減少率		20.0%	6.7%	88.9%	

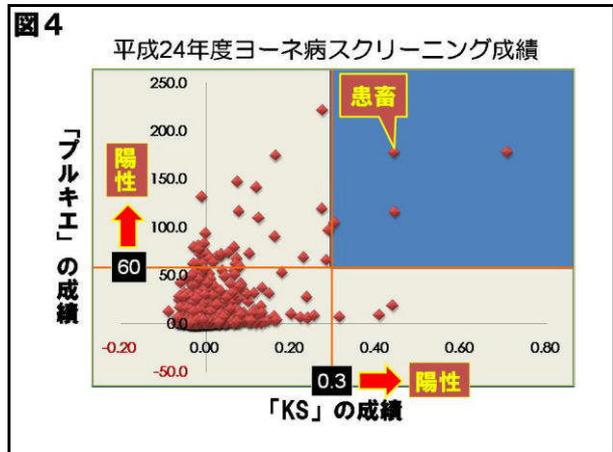


表4

No.	プルキエ	KS	備考
1	181.4	-0.01	
2	177.8	0.04	
3	177.8	0.04	
4	87.0	0.07	
5	182.1	0.07	
6	182.1	0.07	
7	182.1	0.07	
8	182.1	0.07	
9	182.1	0.07	
10	182.1	0.07	
11	182.1	0.07	
12	182.1	0.07	
13	182.1	0.07	
14	182.1	0.07	
15	182.1	0.07	
16	182.1	0.07	
17	182.1	0.07	
18	182.1	0.07	
19	182.1	0.07	
20	182.1	0.07	
21	182.1	0.07	
22	182.1	0.07	
23	182.1	0.07	
24	182.1	0.07	
25	182.1	0.07	
26	182.1	0.07	
27	182.1	0.07	
28	182.1	0.07	
29	182.1	0.07	
30	182.1	0.07	
31	182.1	0.07	
32	182.1	0.07	
33	182.1	0.07	
34	182.1	0.07	
35	182.1	0.07	
36	182.1	0.07	
37	182.1	0.07	
38	182.1	0.07	
39	182.1	0.07	
40	182.1	0.07	
41	182.1	0.07	
陽性数	38	7	
陽性率	1.7%	0.3%	(検体数2,184)
一致率	10.5%	57.1%	
陽性検出率	100%	100%	

が1キット（1プレート93検体用）32,550円、KSが1キット（同）31,500円となっており、KSの方が若干安価であった。

両キットとも、確実に患畜を摘発できることから、ヨーネ病抗体検査のスクリーニングキットとしては、信頼性があると思われた。プルキエとKSの結果に相関はなく、マイコバクテリウム・フレイ菌抽出抗原で血清処理する過程に結果が大きく影響を受けることから、抗原作成用菌株の変更など、より非特異的反応が少ないスクリーニング法の開発又は改良が必要と思われた。

現行のヨーネ病の法定診断では、エライザ法抗体検査だけで診断できることとなっているが、抗体陽性だけでは、非特異反応が排除できない事例が複数例発生したことから、平成25年度から診断方法の変更が予定されており（図5）、リアルタイムPCR検査で直接、糞便中からのヨーネ病特異遺伝子を検出することで患畜を確定でき、スクリーニング検査は任意で実施できることとなる予定である。

この、リアルタイムPCR検査は時間がかかり、通常1日2回搾乳する乳用牛での適用は非常に困難であると考えられる。そのため、本県では来年度からもスクリーニング検査が必要になることから、今回の成績は、適切なキットの選択のための判断材料となると思われた。

**表5**

	ヨーネスクリーニング・プルキエ	ヨーネライザ・スクリーニングKS
非特異	△ 陽性率1.7%	◎ 陽性率0.3%
反応系	◎	○
検査時間	◎ 100分	○ 120分
試薬類	◎ 試薬に着色	◎ 試薬に着色
有効期限	◎ 製造後1年	◎ 製造後1年
金額	○ 32,550円/plate	◎ 31,500円/plate

