

## ヨーネ病スクリーニング遺伝子検査法の有用性について

紀北家畜保健衛生所

○小松 希 丹羽裕子

山田陽子 上田雅彦

### 【背景及び目的】

本県では家畜伝染病予防法第5条に基づくヨーネ病検査は、血清中の抗体検出ELISAによるスクリーニング検査後、陽性個体について確定診断のリアルタイムPCRを実施している（図1）。現在スクリーニングに用いられているELISAより早期に排菌牛を摘発する検査方法として、プール糞便を用いたヨーネ病スクリーニング遺伝子検査（sPCR）が開発された。平成28年4月からは定性判定リアルタイムPCR試薬が販売開始となり、本県ヨーネ病スクリーニング検査についても、今年度からsPCRを実施し、本検査の有用性について考察した。

### 【材料及び方法】

(1) sPCRの有用性について調査するため、ELISAとの比較を行った。  
(2) 平成28年6月から10月に採取した、乳用牛2農場62頭、肉用牛2農場2頭の牛糞便合計64検体について、1～10頭分の糞便混濁液をプールした検体からDNA抽出キット（「ヨーネ・ピュアスピン」（株）ファスマック）を用いてDNAを抽出後、ヨーネプライマーセットRL（（株）ファスマック）を用いてsPCRを実施した。

また、本県では現在ヨーネ病の発生がないため、検査感度・検査手技を確認するため、(3) 定量判定で陽性限界値を示した糞便混濁液1検体を陰性と判定した糞便混濁液9検体とプールした検体についても、同様の検査を実施した。

### 【結果】

(1) sPCRとELISAとの比較を行ったところ、検査材料はELISAでは血清、sPCRでは血清に比べ採材しやすい糞便を使用。多検体処理が可能な点については共通していた。30検体当たりの試薬単価については、ELISAで¥7,900に対し、sPCRでは¥6,000と安価であった。検査所要時間は、作業時間としては差がないが、PCR反応時間を含むとsPCRのほうが長くなる（表1）。

(2) 県内4農場64頭については、非特異反応で偽陽性を示すことなく、全て陰性判定を示した（図2）。

(3) 陽性糞便混濁液とプールした検体は、陽性判定を示した（図3）。

### 【考察】

検査試薬がキット化されているため、試薬による結果のばらつきがなく、検査手技についても簡便であった。自動分析により定性判定を行うため、データ分析は不要で、結果判定が容易であった。DNA量が少ない陽性検体1検体をプールした検体についても陽性判定可能であったことから、感度は高いと判断した。

ヨーネ病を発症した実験感染牛1頭の、経口感染後4年間の継時的な排菌と免疫応答を図4に示した。細胞性免疫は感染後6か月以内に陽性となり、潜伏期を経て排菌開始された時点で糞便リアルタイムPCRでは陽性を示す。抗体価上昇までには、時間がかかるため、感染初期から排菌開始まではELISA陰性排菌牛となり、感染が広がる可能性が高い。より早い段階で感染牛を摘発するためにはPCRが有用であることが分かる。

#### 【まとめ】

sPCRは、安価で多検体処理が可能、採材労力の軽減、感染初期での判定が可能である。これらのことから、現在、ヨーネ病発生のない本県において、他県からの導入等による本病発生防止のため本検査によるスクリーニングは有用であると考えられる。