

—日本で使用されている動物用診断薬 (Ⅹ)—
牛感染症とその診断薬の概説

7 牛 海 綿 状 脳 症

永井英貴[†] (農林水産省動物医薬品検査所)

1 牛海綿状脳症の概要

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伝達性海綿状脳症のうち、牛に係るものが牛海綿状脳症 (以下「BSE」(BSE: Bovine spongiform encephalopathy) という。) である。伝達性海綿状脳症には、そのほか水牛の海綿状脳症、羊・山羊のスクレイピー及び鹿の慢性消耗病が含まれる。また、BSE は人獣共通感染症でもあり、人の変異型クロイツフェルト・ヤコブ病は、BSE を発症した牛の特定危険部位 (脳、脊髄、回腸遠位部等) を摂取することにより感染するものと推測されている。

BSE の病原体は、感染性蛋白質のプリオンであり、宿主の正常プリオン蛋白質の構造異性体である異常プリオン蛋白質がその主要構成要素である。異常プリオン蛋白質が経口的に取り込まれることにより感染が成立する。

BSE は1986年 (昭和61年) に英国で初めて報告され、現在までヨーロッパを中心とする26カ国で19万頭以上発生している (うち約97%が英国)。発生のピークであった1992年 (平成4年) には約3万7千頭の発生をみたが、飼料規制等のBSE対策が功を奏し、2012年 (平成24年) には世界全体で21頭の発生にまで減少している。わが国においては、2001年 (平成13年) 9月に1頭目の感染牛が確認され、同年10月には肉骨粉飼料が完全禁止された。2009年 (平成21年) 1月までに36頭の感染牛が確認されたが、それ以降は発生しておらず [1], 2013年 (平成25年) 5月の国際獣疫事務局 (OIE) 総会において、国際的なBSEの安全性格付け (BSEステータス) の最上位である「無視できるBSEリスク」の国に認定された。

BSE は潜伏期間が長く (平均5~5.5年間) [2], 発症後は、行動異常、過敏反応、運動失調等の神経症状が

認められ、数週間から数カ月の経過で死に至る。病理組織学的には中枢神経系組織の空胞変性が特徴的であり、これがスポンジ (海綿) 状に見えることが本病の病名の由来となっている。

2 診 断 方 法

わが国におけるBSEの検査は、と畜場における検査と死亡牛の検査からなっている。

(1) と畜場における検査

2001年 (平成13年) 9月のBSE患畜の確認を受け、同年10月から行っているものである。と畜場内で解体された、厚生労働省令で定める月齢以上の牛の肉、内臓等については、BSEに係る検査を経た後でなければ、と畜場外に持ち出してはならないと規定されている。この検査は、全頭検査として開始され、その後、検査対象月齢が、平成17年8月からは21カ月以上、平成25年4月からは30カ月超となったものの、全地方自治体で全頭検査が維持されていた。しかし、平成25年7月から検査対象月齢が48カ月超となったことを受けて、地方自治体による全頭検査も中止された。よって、BSEの検査に用いられる診断薬の製造量も大幅に減少している。

(2) 死亡牛の検査

2000年 (平成12年) から家畜伝染病予防事業の一環としてBSEの全国的サーベイランス検査が始められていた。これは、神経症状を呈する牛の脳材料についてBSEの検査を行うもので、年間300検体を目標に始められ、わが国における1頭目の感染牛は、このサーベイランス検査によって発見されたものである。

その後、2001年 (平成13年) 10月からサーベイランスの対象が拡大され、牛海綿状脳症が否定できない牛及び中枢神経症状を示した牛のほかに、24カ月齢以上の死亡牛のうち、年間4,500頭について検査を実施するこ

[†] 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 BSEの診断薬（現在流通しているもの）

エライザ法の種類 (別表第1における区分)	商品名	製造販売業者名	主成分	使用目的	承認年月日
サンドイッチ酵素抗体法	テセーBSE	バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)	抗ヒトプリオン蛋白マウスモノクローナル抗体	牛延髄における異常プリオン蛋白の検出	平成18年 3月23日
サンドイッチ酵素抗体法 (ワンステップ測定法)	フレライザBSE	富士レビオ(株)	抗プリオン蛋白モノクローナル抗体(マウス)	牛延髄における異常プリオン蛋白の検出	平成16年 4月23日
サンドイッチ酵素抗体法 (ワンポット前処理法)	ニッピブルBSE 検査キット	(株)ニッピ	抗プリオン蛋白モノクローナル抗体	牛延髄における異常プリオン蛋白の検出	平成18年 11月13日

ととなった。更に、2002年（平成14年）の牛海綿状脳症対策特別措置法の公布等を受けて、2004年（平成16年）4月からは、24カ月齢以上の死亡牛の全てが検査対象となっている。

このうち死亡牛の検査については、家伝法第5条に規定する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」）として、各都道府県の家畜保健衛生所等において行われている。五条検査の方法は、家畜伝染病予防法施行規則別表第一（以下「別表第一」という。）において規定されており、それは以下の検査方法の組み合わせである。

ア エライザ法による検査

- ① サンドイッチ酵素抗体法
- ② サンドイッチ酵素抗体法（アビジン-ビオチンカップリング法）
- ③ サンドイッチ酵素抗体法（ワンステップ測定法）
- ④ サンドイッチ酵素抗体法（ワンポット前処理法）

イ ウエスタンプロット法による検査

ウ 免疫組織化学的検査

エ そのほかの検査：疫学的検査及び臨床検査

上記の検査法のうち、動物用医薬品として承認を有し、現在流通しているのはエライザ法の①（以下「通常法」という。）、③（以下「ワンステップ法」という。）及び④（以下「ワンポット法」という。）であり、これらについて次項において説明する。

3 診断薬の概要

(1) 反応原理

エライザ法の基本的な反応原理は、通常法、ワンステップ法及びワンポット法の3種類とも同一であり、正常プリオン蛋白質はプロテイナーゼK（以下「PK」という。）によって消化されるものの、異常プリオン蛋白質はPK耐性であることを利用したものである。

牛延髄をPK処理し、残存した異常プリオン蛋白質を、プレートに固相化した抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体で捕捉し、更に酵素で標識した抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体でサンドイッチして、発色基質を加えて吸光度を測定する。

(2) 承認年月日

表のとおり。

(3) 製品の一覧表

表のとおり。

(4) 製法の概要

3種類とも抗プリオン蛋白質モノクローナル抗体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。

(5) 使用方法の概要

- ① 検体（延髄）を採取し、ホモジナイズしてからPK溶液を加えて処理し、遠心した上清を廃棄して、沈渣について可溶化した上で、必要な希釈を行う。
ワンポット法においては、この工程においてバイオマッシャー（破碎棒、フィルターチューブ及び回収用チューブがセットになったもの）を使用することにより簡素化を図っている。
- ② 検体をマイクロプレートに加え、反応させる。
- ③ 洗浄後、酵素標識抗体を加え、反応させる。
なお、ワンステップ法においては、検体と酵素標識抗体を同時に加え、反応させる。
- ④ 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、主波長450nmの吸光度を測定する（副波長は、それぞれ異なる。）。
- ⑤ それぞれカットオフ値を求め、カットオフ値以上の吸光度の検体を陽性、カットオフ値未満の吸光度の検体を陰性とする。

(6) 使用上の注意等

本品において陽性であった場合には、別表第1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。

4 今後の課題

本病は、現時点では生前診断は困難であるが、唾液中の異常プリオン蛋白質を、試験管内で蛋白質ミスフォールディング循環増幅（Protein Misfolding Cyclic Amplification：PMCA）法により増幅し、発症前の診断を可能とする技術が検討されている [3]。

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] 食品安全委員会：BSEに関する基礎資料（食品安全委員会HP：http://www.fsc.go.jp/sonota/bse/bse_kiso_1305.pdf）
- [3] 独農業・食品産業技術総合研究機構：唾液を用いたBSE生前診断法（農研機構HP：http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/niah/2012/170b2_01_11.html）

8 牛 白 血 病

齋藤明人[†]（農林水産省動物医薬品検査所）

1 牛白血病の概要

牛白血病は、全身性の悪性リンパ腫を主徴とする疾病で、牛白血病ウイルス（レトロウイルス科デルタレトロウイルス属）による地方病型と原因不明の散發型がある。牛白血病ウイルスの宿主は、牛及び水牛であるが、実験感染では、めん羊、山羊にも感染する [1]。日本では、1927年に岩手県で初発症が報告され、その後全国に広まっている。1998年に届出伝染病に指定されたことから、1998年以降の発生状況が明確になっており、発生頭数は、1998年の99頭から、2008年には1,045頭、2012年には2,090頭と急増している [2]。

牛白血病ウイルス感染による地方病型の多くは無症状であるが、病態が進むと感染牛の約30%が持続性リンパ球増多症となり、更に病態が進むと3%ほどがB細胞性の白血病を発症する。発症牛は、リンパ節の腫脹、削瘦、元気消失、眼球突出、下痢、便秘などの症状を示し、死亡する。感染牛は、牛白血病ウイルスが血液に含まれることから、牛同士の接触伝播、吸血昆虫による機械的伝播や血液を介した人為的伝播がある。また、感染母牛からその子への子宮内感染や、乳汁にもウイルスは含まれることから、多くはないが乳汁感染もある。

散發型は子牛型、胸腺型、皮膚型に分類され、子牛型は全身リンパ節の腫脹、胸腺型は胸腺の腫脹、皮膚型は発疹・丘疹の形成を特徴とする。発生原因は不明のため、伝播様式も不明である。

地方病型、散發型とも、ワクチンはなく、治療も行わない。

2 診 断 方 法

血清診断としての抗体検査、病原診断としてのウイルス学的検査及び遺伝子検査がある。

抗体検査は、寒天ゲル内沈降反応、間接赤血球凝集反応及び酵素免疫測定法（ELISA）がある。

ウイルス学的検査は、シンシチウム法によるウイルス分離であるが、牛白血病ウイルス以外にも、シンシチウムを形成するウイルスがあるため、蛍光抗体法を用いて培養細胞中の特異蛍光細胞を確認し同定する。

PCR検査は、末梢血リンパ球又は腫瘍組織よりDNAを抽出しプロウイルスを検出する。

3 診 断 薬 の 概 要

牛白血病ウイルス抗体検出用診断薬として、牛白血病診断用沈降反応抗原、牛白血病診断用受身赤血球凝集反応抗原及び牛白血病診断用酵素抗体反応キットの3種類が承認されている。これらの診断薬を表に示した。

(1) 製 法

牛白血病診断用沈降反応抗原は、牛白血病ウイルスを不活化し、精製濃縮後、濃度調整したgp抗原にアジ化ナトリウムを加えたものである。

牛白血病診断用受身赤血球凝集反応抗原は、牛白血病ウイルスを不活化し、精製した抗原で固定羊赤血球を感作し、希釈液中に浮遊させたものである。

牛白血病診断用酵素抗体反応キットは、牛白血病ウイルスを不活化し、牛白血病ウイルスgp51タンパクの精製抗原を、平底マイクロストリップに固相化したものを主剤としたものである。

(2) 使用方法及び判定

使用方法及び判定については、概略を表に示している。詳細は使用説明書を参照のこと。

(3) 使用上の注意

使用に当たっては、添付されている使用説明書に従うこと。特に、検体中には、牛白血病ウイルスが存在する

[†] 連絡責任者：齋藤明人（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 : saito@nval.maff.go.jp

表 日本で承認されている牛白血病診断薬の概要

商品名 (一般的 名称)	製造販売 業者名	使用目的	使用方法 (概略)		承認年月日
			使用方法	判定	
牛白血病 診断用抗原 「北研」 (牛白血 病診断用 沈降反応 抗原)	北里第一 三共ワク チン(株)	ゲル内沈 降反応に よる牛白 血病ウイ ルス抗体 の検出	寒天平板に直径5mmの穴を、中 心に1個とその周囲に6個あけ、 中心の穴に抗原を50 μ l、その左 右対称の2個の穴に指示血清を50 μ lずつ、残りの4個の穴に、被験 血清を50 μ lずつ満し、湿度を保 ちながら、常温で反応させる。	24~48時間反応後に沈降線により判定 する。反応の微弱なもの及び陰性のもの については、96時間目まで観察する。 陽性：抗原と被験血清との間に、標準沈 降線と融合する沈降線を生ずるも の。 陰性：抗原と被験血清との間に、沈降線 がみられず、標準沈降線が外反し て、当該血清を注入した穴に接近 しているもの、又は突き当たって いるもの。	昭和60年 8月21日
牛白血病 抗体アッ セイキッ ト「日生 研」 (牛白血 病診断用 受身赤血 球凝集反 応抗原)	日生研(株)	牛白血病 ウイルス に対する 凝集抗体 の検出	定性試験 1) 検体、指示血清をV型マイク ロプレートに加える。 2) 希釈用液を加え、混合する。 3) 抗原感作羊赤血球液を各穴に 加え、混合する。 4) 常温に1時間静置後、血球凝 集像で判定する。 定量及び阻止試験 1) 2倍階段希釈した検体及び指 示血清を2系列V型マイクロ プレートに加える。 2) 1系列目は定量試験として希 釈用液を加え、2系列目は阻 止試験として凝集阻止反応用 抗原液を加え、混合する。 3) 常温に1時間静置する。 4) 抗原感作羊赤血球液をに加え、 混合する。 5) 常温に1時間静置後、血球凝 集像で判定する。	定性試験 1) 血球凝集像がグレート1以下を陰性 とし、グレート2以上を陽性とする。 2) 指示陽性血清が陽性、指示陰性血清 が陰性と判断できない時は無効であ り、再試験とする。 3) 陽性と判定された検体は、必ず定量 及び阻止試験により確認する。 定量及び阻止試験 1) 定量試験の凝集価が16倍以上で、阻 止試験の凝集価が定量試験の凝集価 より低い時は、陽性と判定し、定量 試験の凝集価を牛白血病ウイルス抗 体価とする。 2) 指示陽性血清が陽性と判定できな い時は無効であり、再試験とする。 3) 定量試験の凝集価が16倍以上であ っても、阻止試験の凝集価が定量試験 の凝集価と同じか高い時は再試験と する。再試験によっても同じ結果の 場合は、判定不能とする。	平成8年 8月14日
牛白血病 エライザ キット (牛白血 病診断用 酵素抗体 反応キッ ト)	JNC(株)	牛血清中 の牛白血 病ウイル スに対す るエライ ザ抗体の 検出	1) 抗原固相化マイクロストリッ プ、試薬類を室温に戻す。 2) 各ウエルに被験血清等を加え、 反応させる。 3) 反応後、洗浄液で洗浄し、標 識体液を加え、反応させる。 4) 反応後、洗浄液で洗浄し、発色 基質液を加え、反応させる。 5) 反応後、反応停止液を加える。 6) 5分以内に吸光度を測定する。 7) 被験血清のS/P値を算出し、 判定する。	S/P値：0.3以上 陽性 S/P値：0.3未満 陰性 ただし、指示陽性血清の平均差引吸光度 0.6以上、指示陰性血清S/P値0.3未満で あること。	平成20年 12月8日

可能性があるため、汚染対策を行い、使用した器具、試薬等も高圧蒸気滅菌を行うこと。

(4) その他

牛白血病診断用沈降反応抗原については、製造が中止となり現在流通しているロット (Lot.48. 有効期限：平成27年3月) が最後となる。

牛白血病ウイルスに対する有効なワクチンや治療法がないことから、診断薬の有効活用により、陰性牛の導入等農場への侵入防止、抗体陽性牛の分離飼育等農場内のまん延防止、経営面を考慮した感染牛のとう汰による清浄化 [3] に役立てていただきたい。

参 考 文 献

- [1] 小沼 操他編：動物の感染症，第二版，110，近代出版，東京 (2002)
- [2] 農林水産省：監視伝染病発生状況の累年比較 (昭和12年~平成24年)，届出伝染病 (農林水産省HP：http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/pdf/h24_ruinen_todoke_130417.pdf)
- [3] 嶋崎智章：牛白血病の衛生対策について，家畜衛生学雑誌，39，113-115 (2013)