

ヨーネ病検査マニュアル

(独立行政法人)農業・食品産業技術総合研究機構
動物衛生研究所・細菌寄生虫研究領域
(ヨーネ病)

1. 疫学調査

- ・汚染地域からの牛導入の有無
- ・輸入牛導入の有無
- ・過去5年以内のヨーネ病発生、あるいは導入先でのヨーネ病発生の有無

2. 臨床検査

- ・慢性の頑固な下痢
- ・泌乳量の低下
- ・下顎部の冷性浮腫
- ・削瘦

3. 細菌学的検査

(1) 糞便塗抹検査 (抗酸菌染色: チール・ネルゼン染色)

糞便の直接塗抹標本を好酸染色し、集塊状の好酸菌を確認する。

染色方法:

- 1) 希釈糞便の塗抹標本作製、火炎固定
- 2) チール・ネルゼン石炭酸・フクシン染色液添加、加温染色4～5分
(湯気が出る程度に加熱、沸騰しないように注意)
- 3) 水洗
- 4) 塩酸アルコールによる脱色 (赤い色が出なくなるまで)
- 5) 水洗
- 6) メチレンブルー液による染色1分
- 7) 水洗、乾燥

(2) ヨーネ菌分離培養法

I. 糞便の処理方法

- 1) 糞便1gを20mlの滅菌生理食塩水で希釈し、激しく混合攪拌する。
- 2) 30分間静置後、上清5mlを20mlの0.75%ヘキサデシルトリジニウムクロライド[®](HPC)と混合する。

HPC溶液は1/2濃度のBrain Heart Infusion (BHI)培地 (DIFCO, Code:237500 等)で作製する。

- 3) 一夜 (16～18時間) 37℃に静置する。
- 4) 900gで30分間遠心し (低温で遠心するとHPCが析出する為、25℃前後で)、上清を捨て、沈殿物を1mlの抗生物質液に再浮遊させ、37℃2日間感作する。

抗生物質液:バンコマイシン(vancomycin) 50 µg/ml, ナリジクス酸(nalidixic acid) 50 µg/ml, アンホテリシン B (amphotericin B) 50 µg/ml, 1/2濃度のBHI培地で作製する。

Vancomycin (Sigma V-2002 等)

Nalidixic acid (sodium salt) (Sigma N-4382 等)

Amphotericin B (ファンギゾン、 Bristol製薬 KK 等)

[抗生物質液作製法]

アンホテリシンBは溶けにくく、1/2 濃度 BHI で作製すると、完全に透明にはならず少しづつ濁ってくるため、以下のようにして液を作製する。バンコマイシン、ナリジクス酸を 1/2 濃度 BHI で作製後、濾過滅菌する。アンホテリシンB（注射用バイアル入り）は滅菌済み 1/2 濃度 BHI で調製し、無菌的に前者に添加する。あるいは、バンコマイシン、ナリジクス酸は通常濃度の BHI 培地で作製、濾過滅菌し、アンホテリシンB（注射用バイアル入り）は滅菌済み蒸留水で調製し、無菌的に前者と等量混合し、各抗生物質の濃度を最終的に合わせる。抗生物質を混合した液は少し濁ってくるがそのまま用いる。また、調製した抗生物質液は小分け後、-20℃に保存する。
(糞便処理法参考文献：Stabel, J. Vet. Diagn. Invest. 9:375-380, 1997)

II. 寒天培地を用いるヨーネ菌の培養検査

1. 培地の準備

- (1) マイコバクチン、卵黄液添加 Middlebrook 7H10 寒天培地 (7H10MEY 培地)、マイコバクチン添加ハロルド培地等、ヨーネ菌の培養に適した寒天培地を用いる。
- (2) 7H10MEY 培地 (Middlebrook 7H10 Agar medium with mycobactin and egg yolk) の作製方法

	培地作製量		
	1 L	1.5 L	3 L
1) Middlebrook 7H10 Agar (Difco 262710)	19 g	28.5 g	57 g
2) グリセリン	5 ml	7.5 ml	15 ml
3) 蒸留水	750 ml	1,125 ml	2,250 ml

加温溶解、121℃ 10 分間オートクレーブ後、55℃程度まで冷却し、下記の成分を加える。

4) Mycobactin (エタノールに溶解, 1mg/ml)	2 ml	3 ml	6 ml
5) 2% Malachite green in DW (高圧滅菌)	2.5 ml	3.7 ml	7.5 ml
6) 50% 卵黄液 (アテクト製等)	150 ml	225 ml	450 ml
7) Middlebrook OADC Enrichment (BD BBL, Code No.:211886)	100 ml	150ml	300 ml
8) Vancomycin (25 mg/ml)	2 ml	3 ml	6 ml
9) Nalidixic acid (塩酸塩) (25 mg/ml)	2 ml	3 ml	6 ml
10) Amphotericin B (ファンギゾン) (10 mg/ml)	5 ml	7.5 ml	15 ml

スターラーで攪拌しながら、培養チューブに分注する (10ml/tube)。

2. 培養方法：

- 1) 抗生物質処理糞便浮遊液 0.1 ml を複数本のヨーネ菌用寒天培地に接種する。
- 2) 接種液が培地全体によくゆきわたるよう培地表面を水平に保ち、培養瓶のフタを弛めて 37℃ 孵卵器内に 5~7 日間保ち、培地表面を概ね乾かした後、フタを締め培養瓶を立てて 37℃ で培養する。
- 3) 培養は 37℃ で 3 ヶ月以上行う。培養後 6 週目から毎週 1 回コロニーの発現を観察する。ヨーネ菌の中には発育が極めて遅い株が存在する為、可能であれば 5 ヶ月間培養を続ける。
- 4) 培地上のヨーネ菌と疑われるコロニーについて、DNA を抽出し、IS900 等のヨーネ菌に特異的な DNA を PCR 法や LAMP 法により検出することによりヨーネ菌を同定する。
- 5) ヨーネ菌コロニーの発現を認めた場合は陽性、認めなかった場合は陰性とする。
- 6) ヨーネ菌同定用 PCR 検査
 - i) 準備
 - a) ヨーネ菌遺伝子増幅試薬 (QuantiTect SYBR Green PCR Kit, Cat.No.:204143(キアゲン社))、あるいは動物用体外診断用医薬品「ヨーネジーン・KS」(共立製薬(株))
 - b) プライマー (ゲル濾過精製以上)

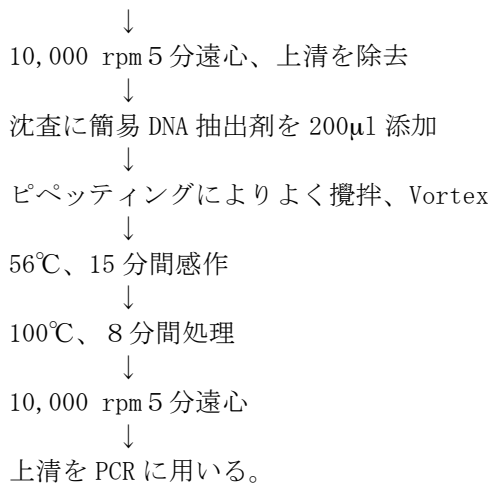
MP10-1 : 5' ATGCGCCACGACTTGCAGCCT 3' (mer:21)

MP11-1 : 5' GGCACGGCTCTGTTGTAGTCG 3' (mer:22)

- c) 簡易 DNA 抽出剤 (BioRad 社、InstaGene[®]等)
- d) 滅菌蒸留水
- e) リアルタイム PCR 装置

ii) DNA の抽出 (InstaGene[®]を用いる場合)

寒天培地上のコロニーより 1 エーゼ程度をとり、滅菌蒸留水にて菌浮遊液を作製



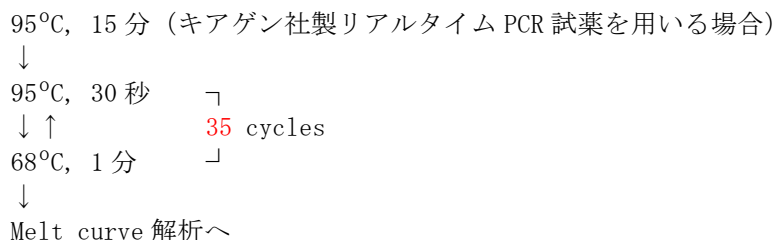
iii) PCR

PCR 用の反応液を下記のように調製する (「ヨーネジーン・KS」を用いる場合はキット添付の術式に従って調製する)。

PCR Master Mix*	25 (μl)
Primer 10-1 (100 pmol/μl)	0.25
Primer 11-1 (100 pmol/μl)	0.25
D. W.	19.5
菌由来 DNA 液	5
Total	50

*QuantiTect SYBR Green PCR Kit(キアゲン社、Cat.No.:204143)

PCR 温度条件



上記の PCR 条件に従ってリアルタイム PCR を行い、融解曲線解析 (Melt curve 解析) において、13 ページ表 2 の各リアルタイム PCR 装置における所定の解離温度を示すピークが認められた場合は陽性とし、ヨーネ菌と同定する。PCR 産物の電気泳動による検査は、検査室のコンタミネーションを起こす可能性が高い為、検査はリアルタイム PCR により実施する。

7) LAMP 法によるヨウネ菌の同定

i) 準備

- LAMP 法用プライマーセット ヨウネ菌 (株式会社ニッポンジーン)、Loopamp® DNA 増幅試薬キット (栄研化学株式会社)、Loopamp®反応チューブ (栄研化学株式会社)
- インキュベーター、UV 照射装置 (蛍光の目視検出用)、ヒートブロックあるいはサーマルサイクラー、LAMP 法専用リアルタイム濁度測定装置 (栄研化学株式会社)
- 簡易 DNA 抽出剤 (BioRad 社、InstaGene®等)
- 滅菌蒸留水、マイクロピペット、フィルター付きチップ等

ii) DNA の抽出

6)-ii の方法に従って DNA を抽出する。

iii) LAMP

蛍光目視検出の場合、LAMP 用の反応液を下記のように調製する。

2x Reaction Mix	12.5 (μl)
Primer Mix Map	2.5
Bst DNA Polymerase	1.0
Fluorescent Detection Reagent Map	1.0
D. W.	3.0
菌由来 DNA 液	5.0
<hr/>	
Total	25

LAMP 法温度条件

66°C, 45 分
↓
80°C, 5 分
↓
蛍光を目視判定

III. 液体培地を用いるヨウネ菌培養検査

1) 液体培地調製法

液体培地: BD BACTEC MGIT ParaTB Medium (ベクトンディッキンソン社、Code, 245154、現在国内の市販カタログには記載されていないが購入可能)

菌増殖の指標: MGIT ParaTB Medium には培養チューブ底面に酸素濃度に反応する蛍光センサーが装着されている。培養チューブ内で菌が増殖し、培地中の酸素が消費され溶存酸素濃度が低下すると、蛍光センサーの蛍光強度が上昇し、チューブ内で菌が増殖したことが間接的に把握できる。蛍光強度の上昇は、何らかの微生物が培養チューブ内で増殖 (酸素を消費) したことを示すのみで、増殖した菌がヨウネ菌か否かの同定試験が必須である。

上記液体培地以外に以下の培地補助添加剤 (ParaTB supplement)、50%卵黄液、糞便処理に用いた抗生物質類、及び滅菌蒸留水が必要。

- BD BACTEC MGIT Para TB Supplement® (培地添加剤; Code, 245156)
- 50%卵黄液 (株アテクト製等)
- Vancomycin、Nalidixic acid (sodium salt)、Amphotericin B
- 滅菌蒸留水

培地作製法: 液体培地に添付された取扱説明書にある通り、以下のように作製した培地添

加剤を培養チューブ 1本あたり **1.5 ml** 添加する。

添加成分	培地添加剤の必要量			
	10 ml	15 ml	30 ml	60 ml
ParaTB Supplement	5.3 ml	8 ml	16 ml	32 ml
2.5% Vancomycin*	40 µl	60 µl	120 µl	240 µl
2.5% Nalidixic acid*	40 µl	60 µl	120 µl	240 µl
1% Amphotericin B**	38 µl	57 µl	114 µl	228 µl
50% 卵黄液	3.3 ml	5 ml	10 ml	20 ml
滅菌蒸留水	1.3 ml	2 ml	4 ml	8 ml
*:25 mg/mlの濃度に蒸留水で作製後濾過滅菌する。-20°C保存				
**:10 mg/mlの濃度に注射用薬を滅菌蒸留水で溶解する。-20°C保存				

2) 抗生物質処理糞便浮遊液 0.1 ml を液体培地 (BD BACTEC MGIT ParaTB Medium®) に接種する。接種後培養チューブをよく転倒混和し 37°C で培養する。

3) 液体培地は、培養チューブ底部の蛍光インディケーターを毎週観察する。(蛍光を観察する為に、長波長 (365 nm) の UV ランプ、400~450nm の UV LED ランプ等を準備する)。蛍光を観察する時に UV ランプを培地底面に近付けすぎると、蛍光を発している培養チューブと発していないチューブとの差が分かりにくい為、ランプは培養チューブ底面から少し離して (10~20 cm 程度) 照射する。

4) 何も接種しない液体培地のコントロールを 2 本以上作製し、同時に培養を開始する。もし、コントロール培養チューブで非特異的な蛍光の上昇を認めた場合は、全ての培養チューブを一度転倒混和し、24 時間後に再度蛍光の有無を観察する。菌の増殖によって蛍光を発している場合は、24 時間後に再度蛍光が認められるが、非特異的な発色の場合は、転倒混和後には蛍光は観察されない。液体培地は 2 ヶ月間培養を続け、最終的な菌増殖の有無を判定する。

5) 蛍光を発した液体培地から培地を少量 (170µl、液体培地量の約 1/50 量) 取り、DNA を抽出してリアルタイム PCR により IS900 を検出、定量する。

液体培地からの DNA の抽出法 :

- i) 培養上清を 100°C 8 分間加熱し、その遠心上清 (13,000 rpm, 5 分) を PCR 検査に用いる。また、ヨーネ菌 DNA 濃度を正確に定量する場合は、市販のヨーネ菌 DNA 抽出・精製キットを用いる。なお、BioRad 社の InstaGene® は液体培地からの DNA 抽出には使用できない。
- ii) リアルタイム PCR 検査は、2 ページの 6) ヨーネ菌同定用 PCR 検査に従って実施する。

IV ヒツジの糞便等からヨーネ菌を分離培養する際の注意点

ヒツジ型ヨーネ菌はバンコマイシンに対して感受性を示す為、ヒツジの糞便等からヨーネ菌を分離する際は、バンコマイシンを除いて液体培地を調製する。なお、ヒツジ型ヨーネ菌の初代分離培養には必ず液体培地を用いることが重要である。

(3) ヨーネ病遺伝子検査 (糞便中のヨーネ菌 DNA の検出)

7 ページ以降にヨーネ病遺伝子検査の詳細な検査方法を記載。

4. 免疫学的検査

(1) エライザ検査

血清中のヨーネ菌に対する抗体を検出する。

市販の牛ヨーネ病診断用エライザキットを使用する。使用方法は製品添付の説明書に従う。

(2) 補体結合反応

血清中のヨーネ菌に対する抗体を検出する。

補体結合反応用抗原を使用して検査する。使用方法は製品添付の説明書に従う。

(3) ヨーニン検査

皮内反応によりヨーネ菌感染個体の細胞性免疫反応を検出する。

ヨーニン皮内反応用抗原を使用して検査する。使用方法は製品添付の説明書に従う。

5. 病理学的検査

(1) 剖検

空腸、回腸、回盲部粘膜の肥厚、顕著な雛壁の形成

腸間膜リンパ節の髄様腫脹

(2) 病理組織学的検査

粘膜固有層、粘膜下識及び腸リンパ節における類上皮細胞のび慢性増殖とラングハンス巨細胞の出現

1) 検査用材料の採取、固定

・採取部位

1. 回腸末端部 回盲部より 10cm 位上
2. 回盲部から 30cm 上
3. 回盲部から 50cm 上
4. 回盲部から 1m 上
5. 空腸（パイエル板が明瞭に見える部位）
6. 回盲リンパ節
7. 回腸部腸間膜リンパ節
8. 空腸部腸間膜リンパ節
9. 雌の場合には乳房上リンパ節

・腸管の採取、固定方法：病理検査用の腸管は約 10cm の長さで、管状に切り取り、管状のまま開かないで、切り取ったあと、一端をピンセットでつまんだまま腸を静かにホルマリン容器に入れ、ピンセットで固定している開口部から 50ml のディスポ注射筒で 10-20% 中性緩衝ホルマリンを注ぎ込み、掴んだピンセットで腸組織を固定液に静かに沈め少し揺する。さらに 2 回ホルマリンを流し込み、静かに固定ビンに沈める。

2) パラフィンブロック作製、染色、鏡検

組織の切り出し(腸管固定標本からは 2～3 カ所切り出すことが望ましい)、パラフィン包埋、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン染色、必要に応じてチール・ネルゼン染色を行い鏡検する。

ヨーネ病遺伝子検査法（糞便中ヨーネ菌 DNA の検出）

ヨーネ菌には種々の特異的遺伝子や挿入配列 (IS) が存在し、それらを利用した Polymerase Chain Reaction (PCR) によるヨーネ菌遺伝子検出系が既に多く報告されている。それらの中でヨーネ菌 IS900 をターゲットとする PCR は、本 IS がヨーネ菌に 15~20 コピー存在する為 (Green, 1989)、高い感度が得られる検出系として有用である。一方、IS900 の DNA 塩基配列にヨーネ菌株間の差は殆どないが、スウェーデンで分離されたヨーネ菌以外の抗酸菌である *Mycobacterium* sp. 2333 株は、IS900 と高い相同性 (94%) 有する IS を保有することが報告されている (Englund, 2002)。そこで、*Mycobacterium* sp. 2333 株を含めヨーネ菌と類似した抗酸菌とは交差しないように PCR 用のプライマーを設計し、種々のリアルタイム PCR 用反応液を比較検討することにより、感度と特異性ともに優れた検査法が確立された。

1. 測定の原理（蛍光色素を用いたインターカレーション法）

ヨーネ菌のみが持つ IS900 中の特定塩基配列を、PCR により試験管内で増幅する。この時、二本鎖 DNA に特異的に結合する蛍光色素である SYBR Green I を反応系に添加しておくことにより、反応の進行に伴って増幅された二本鎖 DNA に SYBR Green I が取り込まれ（インターカレーション）、DNA への結合により蛍光強度が増加する（図 1）。PCR の伸展反応過程で反応液の蛍光強度を測定することにより、PCR 産物の増加をリアルタイムで検出することが可能となる。

インターカレーション法によるリアルタイム PCR では、非特異的な DNA が増幅された場合にも蛍光強度が増す為、特異的反応と非特異反応を区別する為に解離温度解析（メルトカーブ解析、あるいはディソシエーション解析）を行う。2 本鎖 DNA はその塩基配列により Tm 値（2 本鎖 DNA の半分が 1 本鎖に解離する温度）が決まる為、PCR 後に反応液の温度を少しずつ上昇させ、2 本鎖が 1 本鎖に分かれる温度、つまり DNA に取り込まれていた蛍光色素が外れて、蛍光強度が急激に低下する温度を分析する。図 2 に示した例では、増幅された IS900 の PCR 産物は 88℃ 付近から 1 本鎖に分かれはじめるが、非特異的増幅産物は 80℃ 付近から蛍光強度が下がり始めるので、両者を簡単に区別することが可能である。さらに、リアルタイム PCR 検査では PCR によりターゲット遺伝子の増幅が指数関数的に起こる領域内に閾値を設定し、蛍光増幅曲線が閾値と交差する点を Threshold cycle (Ct) 値とし（図 3-A）、Ct 値から各サンプル中のターゲット遺伝子の初期濃度を算出することが可能である。初期 DNA 濃度算出用の検量線を作製するために、異なる濃度の参照 DNA の Ct 値に対してそれぞれの DNA の含有量（対数値）をプロットし（図 3-B）、検量線の一次関数式を求める。本式を用いて、未知サンプルの Ct 値よりサンプル中のターゲット遺伝子量を算出することが出来る（図 3-B）。

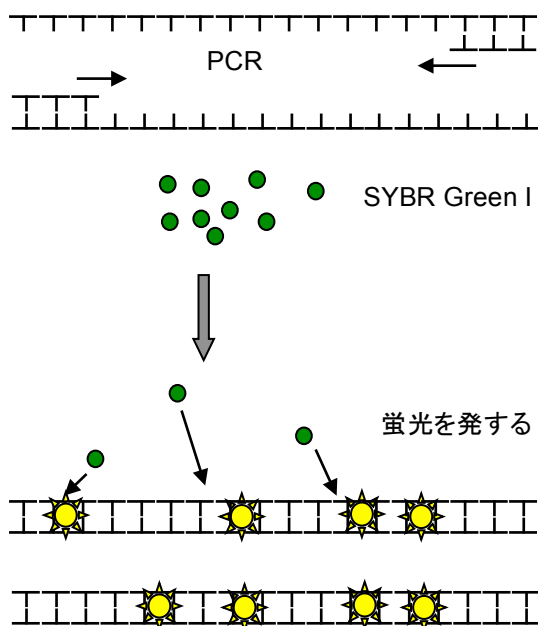


図 1. SYBR Green I インターカレーター法

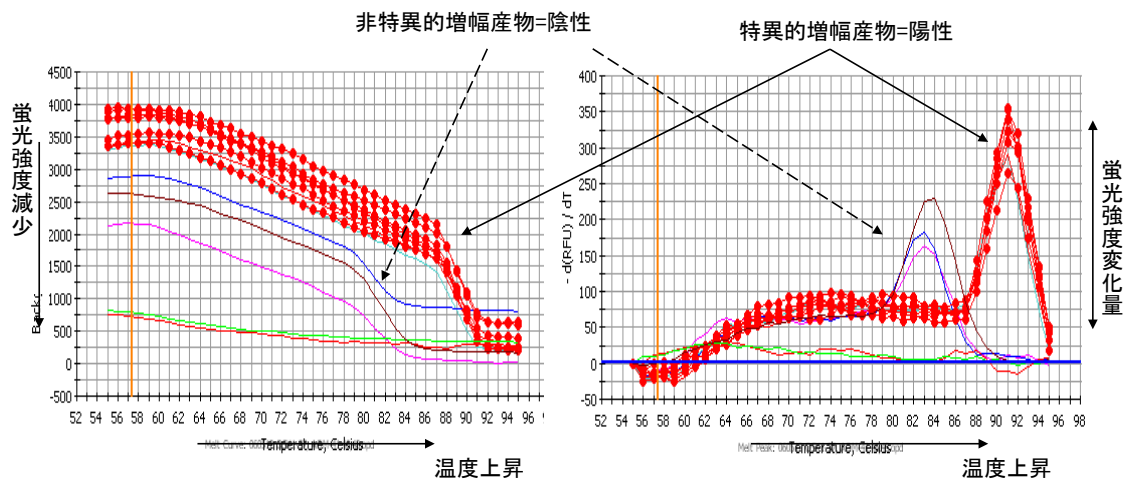
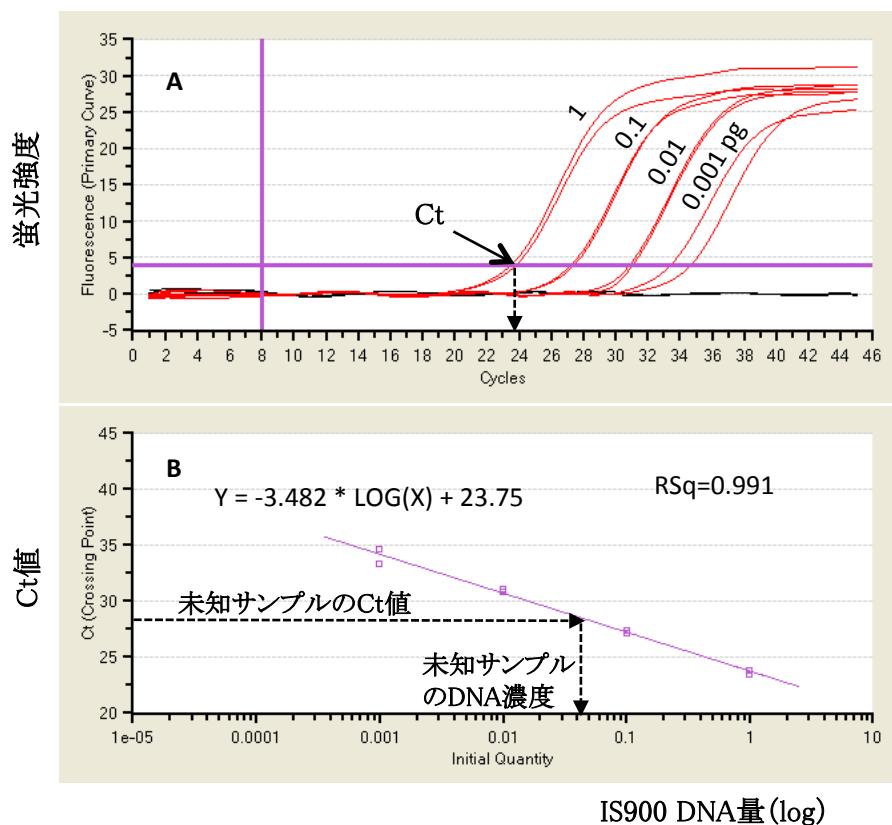


図2. 融解曲線解析による特異性の検討
 左図：温度上昇により解離温度に達すると蛍光強度が低下する。
 右図：上記のデータを一次微分した結果



IS900 DNA量 (log)

図3. スレッシュホルド・サイクル値(Ct値)および検量線による糞便中
 ヨーネ菌IS900DNA量の算出法
 A: 指示陽性DNAを10倍階段希釈し、各well当たり1~0.001 pgの
 DNAを添加した時の蛍光増幅曲線
 B: 各濃度の指示陽性DNAサンプルにおけるCt値より求められた検
 量線 ($Y=-3.482 * \text{Log}(X)+23.75$)より被検サンプル中のヨーネ菌DNA
 濃度を計算する。

2. 試薬・器具の準備

診断薬、試薬類：

- 1) 動物用体外診断用医薬品「ヨーネジーン・KS」（ヨーネ病遺伝子検査薬、共立製薬(株)）
- 2) 牛糞使用ヨーネ菌核酸調製試薬、「ヨーネプレップ®」（共立製薬(株)）
- 3) ヨーネ菌 DNA 抽出キット、「ヨーネスピン ver2®」（(株)ファスマック）
- 4) **ヨーネ菌 DNA 抽出キット、「ヨーネファース®」（共立製薬(株)）**
- 5) クロロホルム
- 6) イソブタノール
- 7) イソプロパノール
- 8) エタノール
- 9) 滅菌生理食塩水、TE 緩衝液（Tris-HCl (pH8.0) 10 mM, EDTA 1 mM）

器具機材類：

- 1) リアルタイム PCR 装置
以下の各社のリアルタイム PCR 装置が使用可能である。

表 1. リアルタイム PCR 装置

メーカー名	機種名
アジレントテクノロジー	Mx3000p
	ABI7300
	ABI7500
アプライドバイオシステムズ	ABI7500Fast
	ABI7900HT
	StepOnePlus
タカラバイオ	Dice TP800
	iCycler
バイオ・ラッドラボラトリーズ	Chromo4
	CFX96
ロシュ ダイアグノスティック	LightCycler 480
	LightCycler 96
	LightCycler Nano

- 2) 2 mL のチューブ：（破碎、抽出用、アシスト社 Code:72. 693. 100 等）
- 3) ビーズ式破碎装置
以下の各社の装置が使用可能である。
 - ・ミニビードビーター（和研薬株式会社）
 - ・マルチビーズショッカー（安井機器株式会社）
 - ・シェイクマスター（株バイオメディカルサイエンス）
 - ・シェイクマスターネオ（株バイオメディカルサイエンス）
 - ・マイクロスマッシュ（トミー精工）
 - ・ファーストプレップ（フナコシ）
 - ・プリセリーズ 24（エムエス機器株式会社）
 - ・その他、ビーズ式破碎機能を有する機器
- 4) 1.5 ml マイクロチューブ
- 5) ピペット、マイクロピペット、チップ等
- 6) PCR 用 96-well プレート及びキャップ（あるいはシール）

3. 検査方法

(1) 糞便からのヨーネ菌 DNA 抽出

以下の何れかの製品を用いて、糞便からのヨーネ菌 DNA 抽出・精製を行う。

- ・牛糞用ヨーネ菌核酸調製試薬、「ヨーネプレップ®」(共立製薬(株))
- ・ヨーネ菌 DNA 抽出キット、「ヨーネスピン ver2®」((株)ファスマック)
- ・ヨーネ菌 DNA 抽出キット、「ヨーネファース®」(共立製薬(株))

1) ヨーネプレップ®を用いる糞便からの DNA 抽出

1. ループスクリュウキャップ (2 mL) にジルコニアビーズ (微粒子) を付属の計量チューブを用いて、容積で 0.3mL、若しくは重量で 1.5 g を分注する。
2. 糞便 1 g を 20ml の滅菌蒸留水、あるいは滅菌生理食塩水で希釈し、激しく混合攪拌する (30 分間)。30 分間静置後、上清 1 mL を微粒子入りのチューブに移す。
3. このチューブを遠心 (10,000 rpm で 5 分) し、マイクロピペットを用いて微粒子より上の上清を除去する (マイクロピペットで上清を除去するとき、微粒子を吸い込まないように注意、多少液が残っていても良い)。
4. このチューブに糞便洗浄試薬 1mL 加え、ミキサーを用いて再懸濁する。さらに、チューブを遠心 (10,000rpm で 5 分) し、マイクロピペットを用いて微粒子より上の上清を除去する (マイクロピペットで上清を除去するとき、微粒子を吸い込まないように注意、多少液が残っていても良い)。
5. このチューブに核酸抽出試薬 700 μ L と有機溶媒 (クロロホルム : イソブタノール = 1 : 1 の混合液、要時調製) 700 μ L を加える。
6. 抽出試薬及び有機溶媒を加えたチューブをビーズ式細胞破碎機を用いて激しく攪拌後 (破碎条件は下記の付記 1. 参照)、遠心 (10,000rpm で 5 分) する。
7. 遠心分離後、上清 350 μ L を、新しい 1.5mL マイクロチューブに移し、さらにイソプロパノール 350 μ L を加える。チューブを転倒混和した後、遠心 (15,000rpm で 10 分) する。
8. 遠心分離後、上清をマイクロピペットで除去する。
9. 沈査の残ったチューブに 70%エタノールを 1mL 加え、チューブの底を指ではじき、チューブ壁面から核酸ペレットを剥がすようにしてリンスする。
10. マイクロチューブを遠心 (15,000rpm で 3 分) し、上清をマイクロピペットで除去する。チューブを再度遠心 (15,000rpm、30 秒~1 分) し、管底に溜まった 70%エタノールを、細いチップ等を用いて 出来る限り完全に取り除く (この時 DNA のペレットには触れないように注意)。風乾せずに次のステップへ進む。
11. 核酸ペレットに、マイクロピペットを用いて TE 緩衝液あるいは D.W. 50 μ L を加え、溶解する。DNA 液は検査を行うまで、氷上に保存する。調製当日に検査を行わない場合は、-20℃ に凍結保存する。

2) ヨーネスピン ver2®を用いる糞便からの DNA 抽出

1. 牛糞便 1 g を 20 ml の滅菌蒸留水、あるいは滅菌生理食塩水で希釈し、激しく混合攪拌 (30 分間) した後、30 分間静置し、上清を採取する (牛糞便懸濁液上清)。
2. 2.0 ml チューブ (ビーズチューブ) に 1. の牛糞便懸濁液上清 1.0 ml を移し、遠心 (20K ×g, 5 分間, 室温) した後、上清を除去する。
3. 600 μl の抽出液 I 及び 6 μl の酵素液を添加する。
4. ビーズ式破碎機に 3. のチューブをセットし、良く破碎する (破碎条件は下記の付記 1. 参照)。
5. ビーズチューブ内に発生した気泡が少なくなるまで室温で 5 分間静置する。あるいは、5 分間静置せず、遠心 (13K ×g, 60 秒間, 室温) により気泡を落とすも良い。
6. 75 μl の抽出液 II を添加し、10 ~ 12 回チューブを転倒し、よく混和する。
7. 遠心 (20K ×g, 10 分間, 室温) する。
8. 上清 500 μl を新しい 1.5 ml チューブに移す。
9. 400 μl の吸着液 III を添加し、10~12 回チューブを激しく転倒させ、よく混和する。
10. 9. の混合液 900 μl を スピнкаラム に移し、遠心 (13K ×g, 30 秒間, 室温) し、濾液は廃棄する。
11. 600 μl の洗浄液 IV を 10. で使用したスピнкаラム に添加した後、遠心 (13K ×g, 60 秒間, 室温) する。
12. スピнкаラム を新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
13. 50 μl の溶出液 V をスピнкаラムに滴下した後、3 分間室温で静置する。
14. 遠心 (13K ×g, 60 秒間, 室温) し、濾液を回収する。

3) ヨーネファース®を用いる糞便からの DNA 抽出

1. 被検糞便約 1g を 20 倍量 (w/v) の滅菌蒸留水、あるいは滅菌生理食塩水で希釈し、激しく攪拌混合する。30 分間静置後、上清 1ml をビーズチューブに移す。
2. 20,000 x g 2 分間遠心後、上清を除去し沈殿を得る。
3. 2. のビーズチューブに Buffer A を 300 μl 添加し、ビーズ式破碎機を用いて破碎処理 (破碎条件は下記の付記 1 参照) を行う。
4. 破碎処理後のチューブをスピンドアウンした後に Buffer B を 300 μl 添加し、キャップを閉めて速やかに激しく攪拌混合する。
5. 20,000 x g 5min 遠心後、遠心上清 450 μl を新しい 1.5ml マイクロチューブ (別売) に移す。
6. これに Buffer C 450 μl を添加して完全に均一になるまでよく攪拌混合し、全量をヨーネファーススピнкаラムに添加する。
7. 15,000 x g 1 分間遠心後、コレクションチューブ内の濾液を廃棄してヨーネファーススピнкаラムを再装着する。
8. Buffer D 500 μl をヨーネファーススピнкаラムに添加して 15,000 x g 1 分間遠心後、濾液がヨーネファーススピнкаラムの先端に付着しないように注意して、ヨーネファーススピнкаラムを取り外し、新しい 1.5ml マイクロチューブ (別売) にセットする。
9. Buffer E 50 μl をヨーネファーススピнкаラムのディスク中央に添加して 15,000 x g 1 分間遠心後、濾液を回収する。

(付記 1.) ビーズ式破碎装置及び処理時間 :

- | | |
|--------------|-----------------------|
| ・ミニビードビーター | 4,600 rpm、3分 |
| ・マルチビーズショッカー | 4,000 rpm、5分 |
| ・シェイクマスター | 1,500 rpm 30分 |
| ・シェイクマスターネオ | 1,500 rpm 15分 |
| ・マイクロスマッシュ | 4,600 rpm、3分 |
| ・ファーストブレップ | 6 m/sec、90秒 (45秒 x 2) |
| ・プリセリーズ 24 | 5,000 rpm、90秒 x 2回 |

(2) リアルタイム PCR 検査

1) 反応液の調製

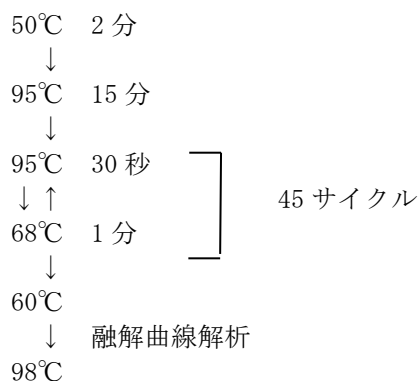
- ① 1 サンプルあたり以下のように反応液を調製する。

核酸増幅試薬	25.00 μ L
プライマー10.1	0.25 μ L
プライマー11.1	0.25 μ L
ウラシル-N-グリコシラーゼ (1 unit/ μ L)	0.50 μ L
リボヌクレアーゼフリー水	19.00 μ L
合計	45.00 μ L

- ② 指示陽性 DNA を TE 緩衝液を用いて、指示陽性 DNA 10 μ L に対し TE 緩衝液 90 μ L の割合で混合し、1pg/2.5 μ L~0.001pg/2.5 μ L まで 10 倍階段希釈する。このとき、TE 緩衝液 90 μ L の分注には、容量 100 μ L~200 μ L のピペットチップを用い、指示陽性 DNA の分注には容量 10 μ L のピペットチップを用いる。ピペッティング容量を 50~90 μ L として、泡立えないようにピペッティングを 10 回行い、よく攪拌する。次いで、マイクロピペットチップを交換し、10 倍階段希釈を行う。作製した各希釈列の指示陽性 DNA は氷上で保管する。
- ③ 反応液 45 μ L に糞便抽出 DNA 液を 5 μ L 添加し、マイクロピペットで良く攪拌する。PCR 用 96 穴プレートを用いる場合は 1 穴あたり 25 μ L ずつ 2 穴に、0.2mLPCR 用チューブを用いる場合は 1 本あたり 25 μ L ずつ 2 本に分注する。
- ④ 各希釈指示陽性 DNA 液 5 μ L を反応液 45 μ L に添加し、よく攪拌後、25 μ L ずつ分注する。陰性対照として DNA 液の代わりに、TE 緩衝液を 5 μ L 添加した反応液を 25 μ L ずつ分注する。
- ⑤ キャップ、あるいはシールを用いて密封した後、ヨーネ菌遺伝子の増幅を行う。

2) 反応条件

リアルタイム PCR 装置を用いて、PCR 条件を以下のように設定する。UNG 処理のために 50°C 2 分間加熱、続いて 95°C 15 分間の DNA ポリメラーゼの熱変性後、95°C 30 秒間の解離反応、68°C で 1 分間のアニーリング及び伸長反応を 1 セットとし 45 回繰り返す。その後、60°C~98°C の範囲で PCR 産物の融解曲線解析 (Melt curve 解析, Dissociation curve 解析) を行う。



3) 試験成立条件

リアルタイム PCR 終了後の解析は基本的には使用機種 of 自動設定で行う。

試験成立条件：

- ① 指示陽性 DNA の原液 (濃度 1pg/2.5 μ L) におけるスレッシュホールド・サイクル (Cycle of threshold; Ct) 値が 24 \pm 3 サイクルであり、指示陽性 DNA の 1,000 倍希釈液 (濃度 0.001pg/2.5 μ L) において、2 穴中 1 穴以上陽性となる。
- ② ヨーネ菌 DNA 濃度と Ct 値との用量-反応式の相関係数 (R) の二乗値 (R²) は 0.9 以上であり、PCR 効率 (Efficiency) は 80~120% である。

*PCR 効率 (Efficiency): リアルタイム PCR の効率は下記の計算式により算出する。

$$\text{PCR 効率 (\%)} = (10^{[-1/\text{slope}] - 1}) \times 100$$

Slope: 検量線の傾き (X 軸を初期 DNA 濃度 (log10), Y 軸を Ct 値とした場合)

- ③ 指示陽性 DNA の融解曲線解析 (一次微分) におけるピークは、各リアルタイム PCR 装置毎の所定の解離温度の範囲内に認める。(解離温度: 融解曲線解析におけるピークは温度上

昇に伴う蛍光強度の減少を一次微分し、プラスマイナスを反転させたグラフであり、そのピーク位置を解離温度とする。)

表2. 各リアルタイム PCR 装置における解離温度

メーカー名	機種名	解離温度
アジレントテクノロジー	Mx3000p	88°C ± 1.5°C
	ABI7300	
	ABI7500	
アプライドバイオシステムズ	ABI7500Fast	87°C ± 1.5°C
	ABI7900HT	
	StepOnePlus	
タカラバイオ	Dice TP800	87°C ± 1.5°C
	iCycler	91°C ± 1.5°C
バイオ・ラッドラボラトリーズ	Chromo4	87°C ± 1.5°C
	CFX96	86.5°C ± 1.5°C
	LightCycler 480	
ロシュ ダイアグノスティック	LightCycler 96	88°C ± 1.5°C
	LightCycler Nano	

④ 陰性対照は、蛍光強度の上昇を認めない。もしくは認めた場合、融解曲線解析において指示陽性 DNA と同じ解離温度で蛍光値のピークを認めてはならない。(蛍光強度の上昇：横軸にサイクル数、縦軸に蛍光強度をプロットしたグラフにおいては、蛍光増幅曲線の立ち上がりとして表示される。)

4) 判定

試験成立条件を全て満たし、かつ反応液の蛍光強度が上昇し、1 穴以上で融解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、蛍光強度が上昇しなかった、あるいはヨーネ菌指示陽性 DNA と異なる解離温度を示した検体は DNA 陰性とする。陽性となった検体については、指示陽性 DNA を用いた用量-反応式から検体中のヨーネ菌 DNA 濃度が計算される。なお、DNA 濃度 0.001pg/2.5 μL 以上のとき、ヨーネ菌分離成績と高い一致率を示す。ヨーネ病感染の有無の判定は、家畜伝染病予防法施行規則の別表 1 の判定基準 (指示陽性 DNA 液を用いた用量反応式からヨーネ菌 DNA 濃度を計算し、検体 0.0025cc 中の DNA 量が 0.001pg 以上と判定された検体を陽性、それ以外の検体を陰性とする。) に従って行う。

4. ヨーネ病検査の精度管理 (糞便からの DNA 抽出法の精度管理)

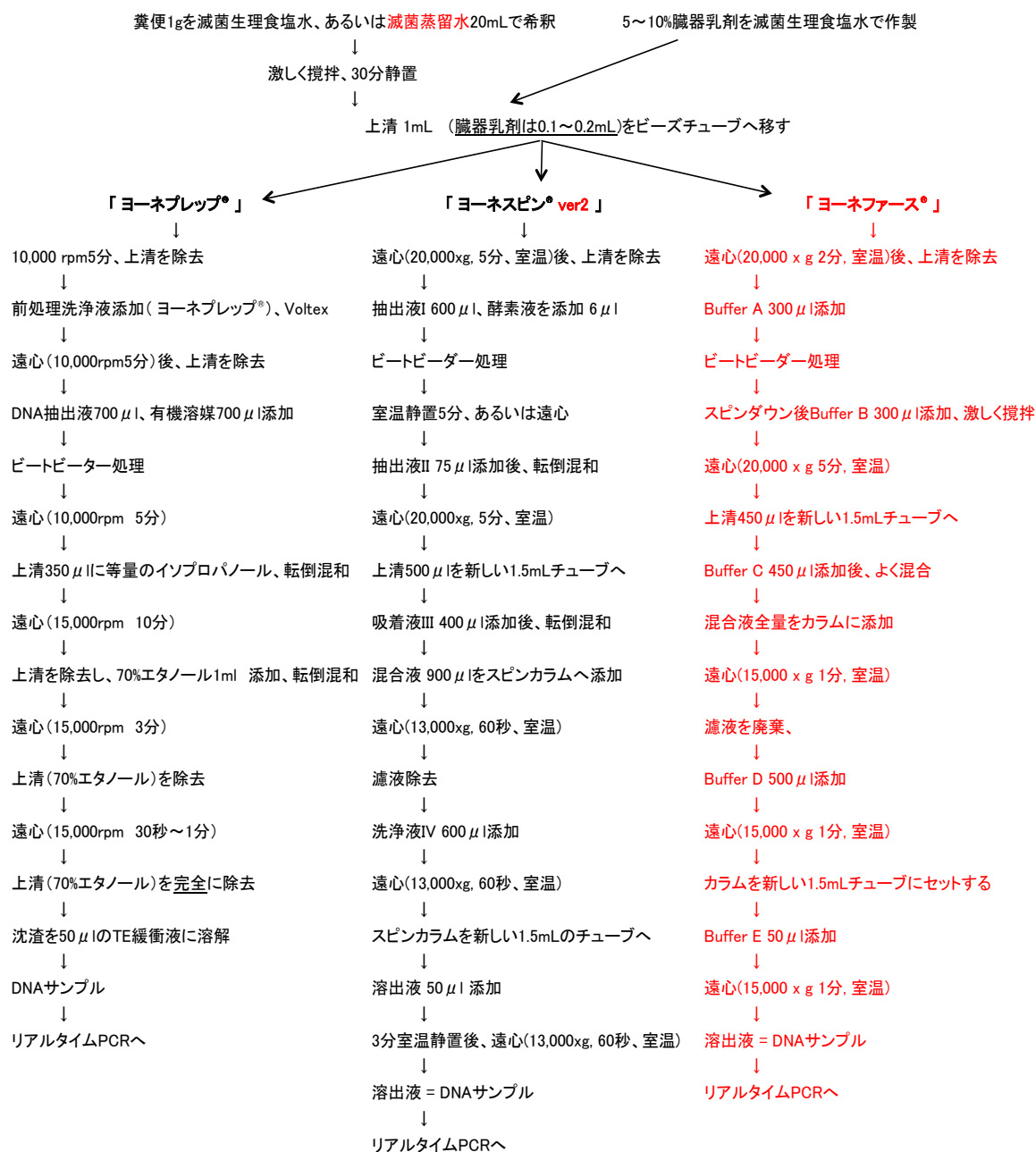
リアルタイム PCR 検査を実施する場合は、DNA 抽出検定用糞便 (動物衛生研究所から供給) を用い、ヨーネ菌 DNA 抽出効率の検定を行う。ヨーネ菌遺伝子抽出キットを用いた検定用糞便からの遺伝子抽出効率が許容範囲内であることを確認する。その後、野外サンプルを用いて検査を実施する。

5. PCR 実施上の注意点 (コンタミネーションによる偽陽性の防止)

- 1) テンプレート DNA を含まない陰性対照サンプルを必ず同時に置き、PCR が陰性となることを確認する。
- 2) PCR 反応液を調製する場所、DNA を抽出する場所、及び PCR を行う場所を別にする。
- 3) PCR 前のサンプルを扱うマイクロピペット及びチップと、PCR 後のサンプルを扱うマイクロピペット及びチップを別にする。
- 4) チップはフィルター付きのものを用いる。
- 5) 取り扱いには常に手袋をして行い、手袋が汚染された可能性が少しでもあれば、手袋を取り替える。
- 6) 抽出 DNA 液等のチューブの蓋を開けるときは短時間の遠心を行う。

6. ヨーネ病検査方法に関する問い合わせ先
動物衛生研究所細菌寄生虫研究領域
森 康行
TEL & FAX:029-838-7857
Mail:yamori@affrc.go.jp

糞便・臓器乳剤からの DNA 抽出・精製法（フローチャート）



* 臓器乳剤では「ヨーネスピ® ver2®」あるいは「ヨーネファース®」により抽出したDNAを用いた方が、効率良くヨーネ菌DNAが増幅される。PCR阻害物質の除去率が高いと思われる。

病理切片からの抗酸菌 DNA 抽出

1. Takara DEXPAT®(タカラバイオ、Code:TKR-9091)による DNA 抽出

- 1) 組織切片 (5~10 μ m) 1~5 枚、1.5 ml チューブへ
↓
- 2) DEXPAT 0.5 ml 添加
↓
- 3) 100°C加熱 10 分
↓
- 4) 12,000 rpm 10 分 遠心
↓
- 5) DNA 溶液を回収

*詳細は製品添付のプロトコールに従う。

2. ヨーネプレップによる DNA 抽出

- 薄切した (5~10 μ m) 組織切片 1~5 枚
↓
- キシレン 1ml 添加、Vortex、37°C 5 分
↓ ↑ } x 2 回
- 12,000rpm 5 分、上清除去
↓
- 100%エタノール 1 ml 添加、Vortex
↓ ↑ } x 2 回
- 12,000rpm 5 分、上清を除去
↓
- ビーズを添加、DNA 抽出液、有機溶媒添加 (ヨーネプレップ、共立製薬(株))
↓
- ビートビーター処理、4600rpm、3 分
↓
- 10,000rpm 5 分
↓
- 上清+等量のイソプロパノール、転倒混和
↓
- 15,000rpm 10 分 遠心
↓
- 上清を除去し、70%エタノール 1 ml 添加、転倒混和
↓
- 15,000rpm 3 分 遠心
↓
- 上清を完全に除去
↓
- 50ml の TE buffer、あるいは DW に溶解する。

組織切片からのヨーネ菌検出に関する参考文献：

- 1) Plante Y, Remenda BW, Chelack BJ, Haines DM.(1996). Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues by the polymerase chain reaction. *Can J Vet Res.* 60(2): 115-120.
- 2) Coetsier C, Vannuffel P, Blondeel N, Deneff JF, Cocito C, Gala JL. (2000). Duplex PCR for differential identification of *Mycobacterium bovis*, *M. avium*, and *M. avium subsp. paratuberculosis* in formalin-fixed paraffin-embedded tissues from cattle. *J Clin Microbiol.* 38(8): 3048-3054.