

令和2年3月25日

安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業  
研究成果報告書

課題番号：3102

インターフェロングammaアッセイ法を用いた牛結核病の診断法の導入

研究期間：令和元年度（1年間）

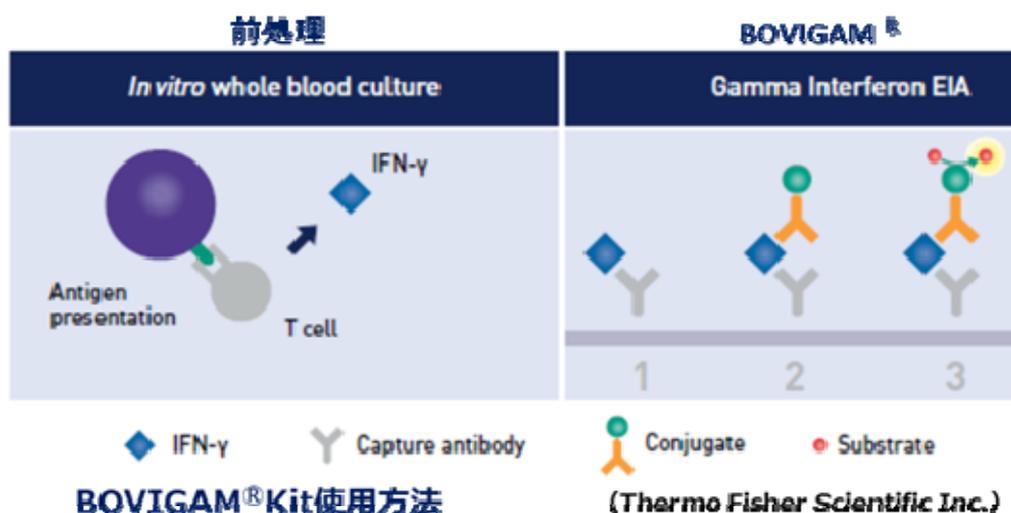
研究総括者名：永田 礼子

試験研究機関名：国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構

## 1 研究目的

我が国における牛の結核病については、家畜伝染病予防法（以下「法」という。）に基づきサーベイランスを実施しており、近年、本病の発生は確認されておらず、現在、全国で清浄性確認サーベイランスを実施している。しかし、本病の診断は法で規定するツベルクリン検査によって行われているが、スクリーニング検査と確定検査が同一の検査法であるため、繰り返し検査による免疫不応答性があると考えられる。また、現行のスキームでは、最終判定まで 60 日間を要し、その間の農場の負担が増すほか、複数回、農場に立ち入るため、より効率的かつ迅速な検査が求められる。一方、欧米諸国の中には、ツベルクリン検査をスクリーニング検査として位置付け、より迅速かつ2回の農場訪問により本病を診断する方法として、インターフェロン $\gamma$ （IFN- $\gamma$ ）アッセイを導入している国がある。これを踏まえ、我が国における本病のサーベイランスを効率的に継続するに当たり、既に海外での活用実績のある IFN- $\gamma$ アッセイ（診断キット BOVIGAM<sup>®</sup> : OIE 承認番号 ; 20150110）（下図）導入し、国内の新たな検査体系を構築する。

IFN- $\gamma$ アッセイはツベルクリン同様、T リンパ球が関与する細胞性免疫応答を指標とした検査であり、抗原刺激あるいは未刺激培養の上清（血漿）中の牛 IFN- $\gamma$ を EIA（酵素免疫測定法）により *in vitro* で検出することができる。ツベルクリン検査が生体内に抗原を投与するのに対して、当該検査は全血を用いるため、繰り返し検査による免疫不応答等を考慮する必要がなく、検査間隔の短縮と農場立ち入り回数の削減が期待できる。また、OIE 承認診断法である当該検査による清浄性確認サーベイランスは国際的にも有用である。



## 2 研究内容

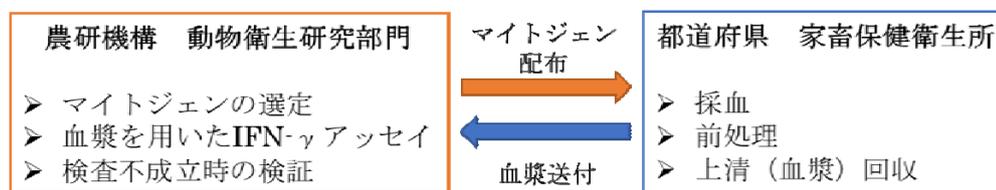
### (1) 研究課題

#### 1) 中課題1：IFN- $\gamma$ アッセイを用いた新たな検査体制の確立

- ・小課題1：IFN- $\gamma$ アッセイの検査成立条件の決定

IFN- $\gamma$ アッセイの前処理として、全血に刺激抗原 Bovine Tuberculin PPD (purified protein derivative) (B-PPD；牛型結核菌抗原)、対照抗原として Avian Tuberculin PPD (A-PPD；鳥型結核菌抗原)を添加、培養し、抗原非添加の未刺激コントロールを陰性対照として、それぞれの培養上清を得る。一方、体外では全血中の T リンパ球の活性が経時的に低下するため、採血後なるべく速やかに検体を検査室に輸送し、抗原刺激を行うことが望ましい。我が国では農場における採材から検査室での前処理までの過程を都道府県の家畜保健衛生所が担うことを想定しているが、検体の前処理時にリンパ球が失活している可能性があるため、また、個体の免疫応答は様々であるため、リンパ球の活性を担保する評価系が必要となる。そこで、抗原非特異的にリンパ球を活性化させる物質であるマイトジェンを抗原刺激の陽性対照として用いることで検査成立の確認を可能とする。具体的には、乳用及び肉用牛の様々なステージにおける免疫応答の個体差が BOVIGAM<sup>®</sup>に与える影響を評価し、検査が成立するために最適なマイトジェン及び濃度の組み合わせを決定する。

IFN- $\gamma$ アッセイの前処理は都道府県家畜保健衛生所において実施することを想定し、研究実施概要を下図に示す。



#### 研究実施概要

- ・小課題2：牛体内での反応性の確認

過去に国内で流行した病原株 (*Mycobacterium bovis* 牛 10 株) に対する細胞性免疫応答を確認するため、当該株の死菌で免疫した牛を用いて IFN- $\gamma$ アッセイの感度を調べる。

また、非特異的な細胞性免疫応答の有無を確認するため、結核病以外の抗酸菌 (ヨーネ菌) 感染牛を用いて IFN- $\gamma$ アッセイの特異度を調べる。

- ・小課題3：検査マニュアルの作成

小課題1及び2で得られた成績を踏まえて、都道府県家畜保健衛生所における検査標準プロトコルの雛型、確定検査実施機関における検査作業マニュアルを作成する。

(2) 年次計画

項目	令和元年度
1. IFN- $\gamma$ アッセイを用いた新たな検査体制の確立	
(1) IFN- $\gamma$ アッセイの検査成立条件の決定	← 検査成立条件の決定 →
(2) 牛体内での反応性の確認	← 反応性の確認 →
(3) 検査マニュアルの作成	← マニュアル作成 →
所要経費 (合計)	6,886 千円

(3) 実施体制

項目	担当研究機関	研究担当者	エフォート (%)
研究総括者	農研機構 動物衛生研究部門	永田 礼子	10
1. IFN- $\gamma$ アッセイを用いた新たな検査体制の確立	農研機構 動物衛生研究部門	○ 永田 礼子	前出
(1) IFN- $\gamma$ アッセイの検査成立条件の決定	農研機構 動物衛生研究部門	△ 永田 礼子 川治 聡子 上野 勇一 大崎 慎人	前出 5 5 5
(2) 牛体内での反応性の確認	農研機構 動物衛生研究部門	△ 永田 礼子 川治 聡子 上野 勇一 大崎 慎人	前出 前出 前出 前出
(3) 検査マニュアルの作成	農研機構 動物衛生研究部門	△ 永田 礼子 川治 聡子 上野 勇一 大崎 慎人	前出 前出 前出 前出

研究担当者欄について、中課題担当者には○、小課題担当者には△を付すこと。

3 研究推進会議の開催状況

別紙の(1)のとおり

## 4 研究成果の概要

### (1) 主要な成果

#### ア 成果の内容（別紙の（2）参照）

##### （ア）牛結核病の新たな診断法の確立

日本における牛結核病のサーベイランスを効率的に継続するに当たり、IFN- $\gamma$ アッセイの検査成立条件を決定し、検査精度の検証とマニュアルを作成したことで、新たな診断法を確立した（p5）。

#### イ 成果の活用（別紙の（2）参照）

（ア）家畜伝染病予防法施行規則で規定する牛結核病の検査法に盛り込む方向で検討。

### (2) 各研究課題の成果

#### ア 中課題1（IFN- $\gamma$ アッセイを用いた新たな検査体制の確立）の研究成果

##### （ア）工程管理及び成果目標

工程表
① 抗原刺激陽性コントロール（マイトジェン）を家畜保健衛生所へ配布し、血漿を回収して動物衛生研究部門において IFN- $\gamma$ アッセイを実施、試験成立条件の検討（小課題1 関連）。 <i>Mycobacterium bovis</i> 免疫牛及び結核病以外の抗酸菌感染牛における IFN- $\gamma$ アッセイの感度及び特異度の検証（小課題2 関連）。 ↓
② 決定した検査法をもとに、都道府県家畜保健衛生所における検査標準プロトコルの雛型、確定検査実施機関における検査作業マニュアルを作成（小課題3 関連）。
成果目標：令和2年度中に IFN- $\gamma$ アッセイを用いた牛結核病の診断法を家畜伝染病予防法施行規則で規定する確定診断法の一つとして位置付けるために、検査成立条件を決定し、都道府県家畜保健衛生所における検査標準プロトコルの雛型、確定検査実施機関における検査作業マニュアルを作成。

#### （イ）各工程の進捗状況及び成果

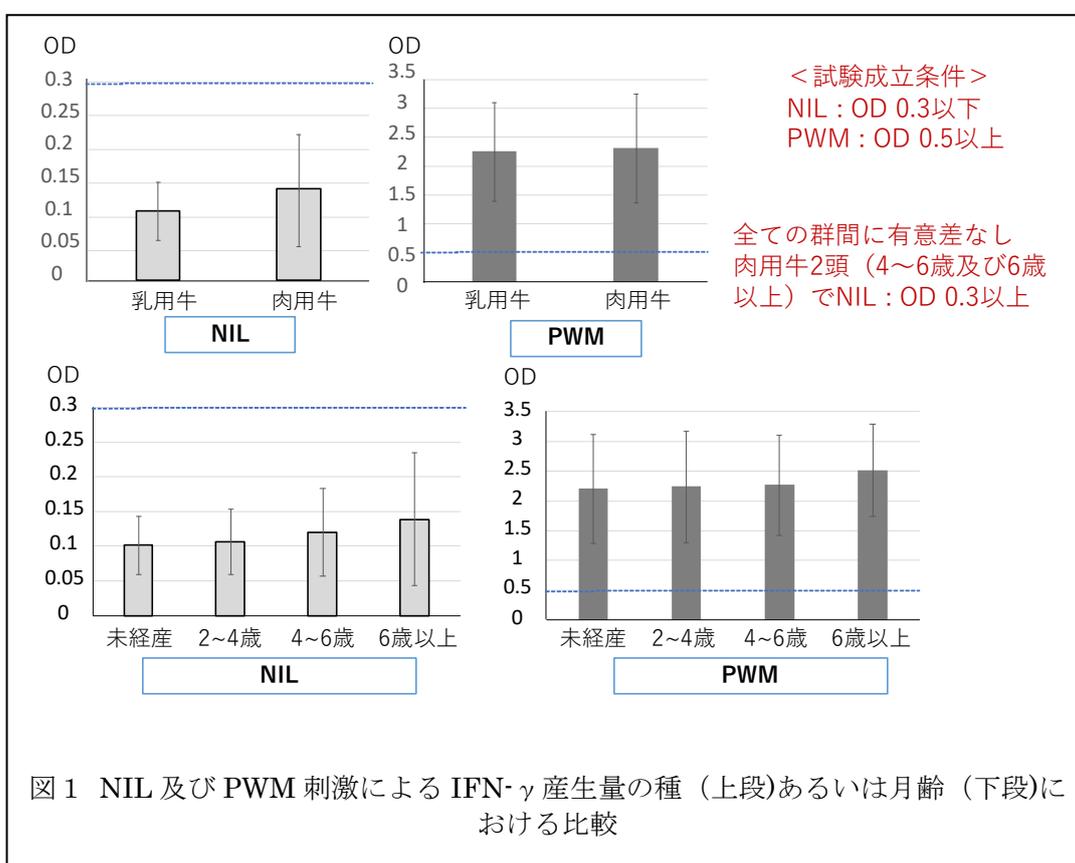
##### 【工程表の①】

採血及び IFN- $\gamma$ アッセイの前処理法を都道府県家畜保健衛生所において実施するにあたり、協力依頼のパフレット（家畜保健衛生所向け及び農家向け）を作成した（別添1）。3 都道府県、5 家畜保健衛生所において、種及び月齢バランスよく農場を選定し、3 農場／都道府県、15 頭／農場、計 135 頭の免疫応答を調べた。前処理法のプロトコール（別添2）を作成し、協力家畜保健衛生所へ配布した。

前処理において、抗原刺激の陽性対照として、抗原非特異的にリンパ球を活性化さ

せる物質であるマイトジェンの Pokeweed Mitogen (PWM) 5  $\mu\text{g}$  及びコンカナバリン A (ConA) 10  $\mu\text{g}$  を配布した。PWM は T 及び B リンパ球、ConA は T リンパ球のマイトジェンであり、IFN- $\gamma$  産生応答の感度が高いのは PWM の方であった。従って、当該 IFN- $\gamma$  アッセイにおけるマイトジェンの判定基準に規定されているように、PWM 5  $\mu\text{g}$  刺激培養後の上清中 IFN- $\gamma$  の吸光度 (OD) 0.5 以上をリンパ球機能低下の判定基準とした。また、NIL 判定基準は規定の 0.3 以上とした。

全ての家畜保健衛生所における前処理法は適切であることを確認し、2 検体で牛個体の免疫状態が原因と考えられる不成立があったが、それ以外の全ての検体は試験成立条件を満たしていた。野外検体計 135 頭の血液の NIL 及び PWM 刺激培養後の上清中 IFN- $\gamma$  の OD を比較解析した結果、種及び月齢による有意差は認められず、日本においても当該アッセイは利用可能であることが示唆された (図 1)。

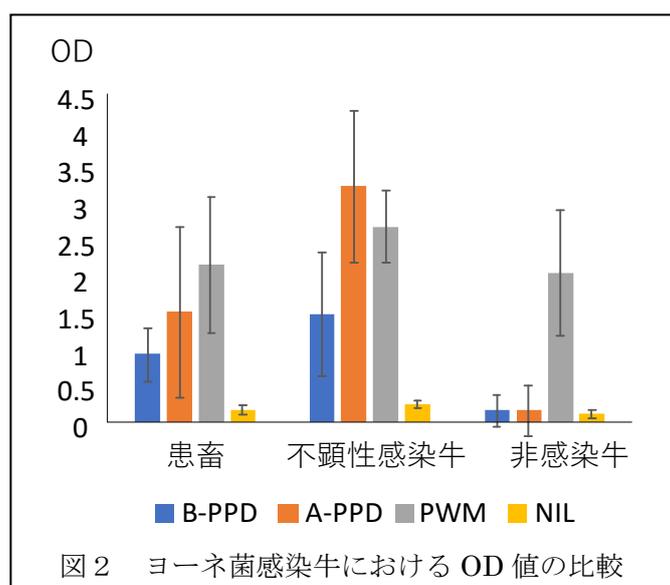


牛体内での反応性を確認するため、過去に国内で流行した牛型結核菌 *Mycobacterium bovis* (牛 10 株) の死菌を免疫して作出した感作牛を用いて、IFN- $\gamma$  アッセイの感度を調べた。全ての感作牛は B-PPD に対する IFN- $\gamma$  産生量が非常に高く、特異的な抗原応答が認められた。しかし、今回の感作牛はヨーネ菌接種後非排菌の無症状牛を用いたためか、対象抗原である A-PPD に対する IFN- $\gamma$  産生量も高く、4 頭中 1 頭で陽性判定の基準  $B > A$  を満たさず僅かな差で  $B < A$  のため陰性判定の結果

となった（表1）。このことから、ヨーネ菌等の抗酸菌との混合感染の場合は、 $B < A$ のため判定は牛結核病陰性となる可能性があることが示唆された。また、 $IFN-\gamma$ アッセイと同じく細胞性免疫応答を指標とした検査法である皮内反応においても同等の感度を示した。特に、比較頸部皮内反応（頸部に B-及び A-PPD 抗原接種し、腫脹差により判定）の結果は、4頭中1頭で僅かな差で  $B < A$  のため陰性判定の結果となった（表1）。特異度は、健康牛 17 頭及び結核菌と同じ抗酸菌に属するヨーネ菌感染牛 11 頭全てにおいて、 $IFN-\gamma$ アッセイの判定は陰性であった。ヨーネ菌は結核病と同じく法定伝染病であるヨーネ病の原因菌であり、ヨーネ病患者は日本において年間数百頭が摘発されている。ヨーネ菌感染との交差反応を調べるため、ヨーネ菌感染牛（患畜 4 頭及び無症状の不顕性感染牛 5 頭）及び非感染牛 22 頭における  $IFN-\gamma$ アッセイを実施した。ヨーネ菌感染牛は非感染牛に比べて B-PPD に対する免疫応答は高いが、A-PPD に対する免疫応答の方が高いため、牛結核病は陰性判定であった（図2）。以上より、 $IFN-\gamma$ アッセイは高い感度及び特異度が認められたが、混合感染などでは判定基準が当てはまらない事例が生じることが明らかとなった。

表1 牛型結核菌の感作牛における  $IFN-\gamma$ アッセイの感度

感作牛	$IFN-\gamma$ アッセイ	比較頸部皮内反応（腫脹差）
#90	陽性 ( $B > A$ )	陽性 ( $B > A + 5.5\text{mm}$ )
#91	陽性 ( $B > A$ )	陽性 ( $B > A + 19\text{mm}$ )
#92	陽性 ( $B > A$ )	陽性 ( $B > A + 10\text{mm}$ )
#93	陰性 ( $B < A$ )	陰性 ( $B < A - 1\text{mm}$ )



さらに、キットでは 30 時間以内となっている前処理における採血後抗原刺激までの時間について、条件検討の結果、抗原刺激までの時間が長くなるほど OD 値は低下し、6 時間までに急激に活性が低下する個体が認められ（図 3）、これは採血直後から白血球の活性が低下することに起因する。未刺激の場合は、時間が長くなると OD 値が上がることもあり、細胞破壊などによる刺激が加わることによると思われる。従って、採血後抗原刺激までの時間は 4 時間以内に行われることが望ましい。

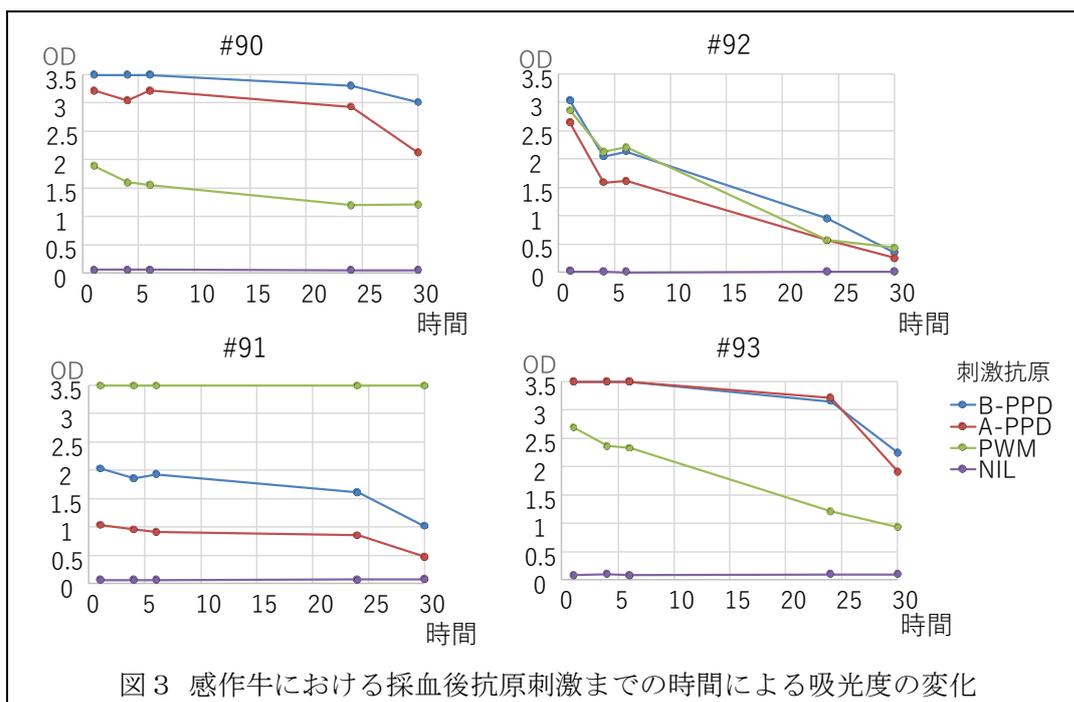


図 3 感作牛における採血後抗原刺激までの時間による吸光度の変化

#### 【工程表②】

決定した検査法をもとに、都道府県家畜保健衛生所等における検査標準プロトコルの雛型（別添 3）及び確定検査実施期間における検査作業マニュアル（別添 4）を作成した。判定基準については、本課題で明らかとなった問題点を今後行政と検討する必要がある。

#### (ウ) 成果目標に対する達成状況

検査成立条件を決定し、検査標準プロトコルの雛型及び検査作業マニュアルを作成し、目標を達成した。

**5 研究成果の発表（主要な論文、取得した（申請中）の特許等を記述）**

別紙の（3）～（8）のとおり

**6 目的の達成に当たっての現時点での問題点等**

牛結核病の新たな診断法を確立し、目標を達成した。今後は、家畜伝染病予防法施行規則で規定する牛結核病の確定診断法の一つとして位置付ける予定。

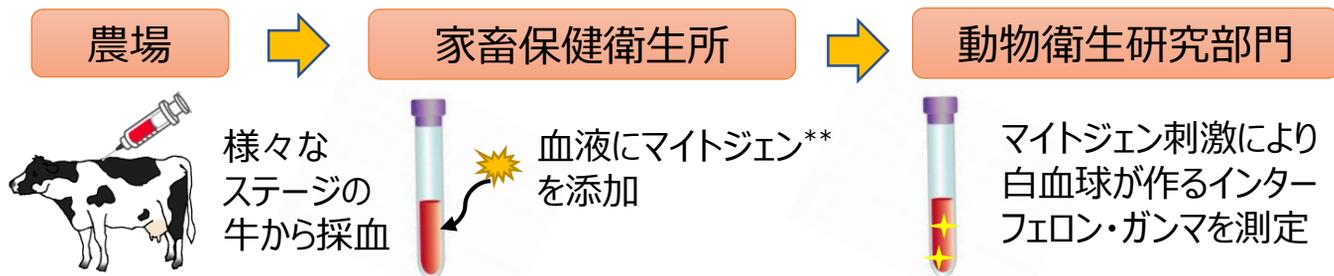
# 牛結核病の新しい検査法の検討

農研機構 動物衛生研究部門

## 背景

- 牛の結核病は、我が国ではこれまでの乳用牛を中心とした定期検査により、近年の発生は確認されていません。そこで、2018年度から3年間、清浄性確認サーベイランス（全国約3,000戸の農場を検査）を実施しています。
- 清浄性確認サーベイランス後、牛結核病の検査を効率的に継続するため、現在のツベルクリン検査に加え、海外での活用実績のあるインターフェロン・ガンマ\*検査を行う予定です。
  - \*) インターフェロン・ガンマとは、免疫活性化に重要なタンパク質（サイトカインの一種）のこと
- インターフェロン・ガンマ検査は、国内では初めて行うため、検査の条件検討が必要です。

## 検証の内容



\*\*\*)マイトゲンとは、病原体ではない刺激物質であり、白血球を活性化し、インターフェロン・ガンマを産生させる

- 白血球が正常に働けばマイトゲン刺激により、インターフェロン・ガンマが作られます。
- 病原体でない物質のマイトゲンで白血球を刺激し、種や月齢が異なる牛の白血球の活性を比較して、インターフェロン・ガンマ検査の成立条件を決める予定です。

**<注意点> 採血はツベルクリン接種前か1週間以上間隔をあけてください。**

**今回の検査は、牛結核菌の抗原は配布しないため、牛の結核病の診断はできません。**

## 研究の成果利用

- インターフェロン・ガンマ検査はツベルクリン検査より検査精度が高く、検査間隔も短縮できるため、優れた結核病の検査です。
- 2021年度からツベルクリン検査陽性牛に対してインターフェロン・ガンマ検査が行われます。

# 牛結核病の新しい検査法の条件検討にご協力ください

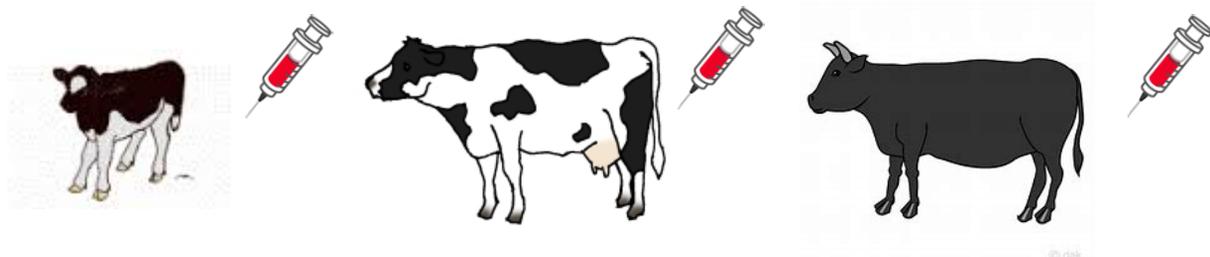
農研機構 動物衛生研究部門

## 背景

- 牛の結核病は、我が国ではこれまでの乳用牛を中心とした定期検査により、近年の発生は確認されていません。
- 今後、牛結核病の検査を効率的に続けるため、現在のツベルクリン検査に替わる新しい検査法の導入を予定しています。
- 国内では初めて行う検査法であるため、検査の条件検討が必要です。

## 内容

種や月齢が異なる牛から採血し、白血球を刺激する物質を加えて、白血球の活性を調べます。



対象牛：乳あるいは肉用牛の雌，6カ月齢以上の健康な牛

対象牛ステージ：

未経産	2-4歳	4-6歳	6歳以上
-----	------	------	------

農場あたり15頭くらい（6歳以上は可能な範囲でお願いします）



病原体ではない物質で白血球を刺激して、新しい検査法の成立条件を決定します。

**今回の検査は牛結核病の検査ではないため、診断はできません。**

# 牛結核病の新しい検査法（インターフェロン・ガンマアッセイ）の条件検討

## スケジュール：

資材配布；8月中

家保での実施；10月まで（農場ごとに異なる採材日の場合は、都度送付）

動衛研での試験；11月中（インターフェロン・ガンマアッセイの結果、非常に値の低いあるいは高い個体について、可能であれば時間を空けて、再度採血・抗原刺激をお願いすることがあるかもしれません。その場合はご相談差し上げます。）

結果還元；インターフェロン・ガンマアッセイ終了時（農場ごと）

## 配布資材：

- ・ヘパリン入り真空採血管（頭数分）
- ・最高最低温度計
- ・24 well組織培養用プレート
- ・1.5 mlアシストチューブ（蓋に名前入りシール付き）
- ・1.5 mlアシストチューブ保管ラック
- ・動衛研へ送付用発泡スチロール
- ・着払い伝票
- ・抗原3種類、各6本+予備1本（100  $\mu$ l/well、農場当たり2本使用）  
（Nil、PWM、ConA；-20  $^{\circ}$ C保管、使用時に融解し、使い切りにする。）

PWM（Pokeweed Mitogen）およびConA（コンカナバリンA）：

リンパ球を抗原非特異的に刺激する物

**\* 抗原のみ冷凍便**

他に、採血時の針やホルダーが必要でしたらご連絡ください。

また、実施期間など、お気づきの点がございましたらご連絡ください。

# 牛結核病の新しい検査法（インターフェロン・ガンマアッセイ）の条件検討

## 準備：

- ・ヘパリン入り真空採血管 ・最高最低温度計
- ・24 well組織培養用プレート ・1.5 mlアシストチューブ
- ・200 μlピペット ・1,000 μlピペット ・チューブ立て
- ・炭酸ガス孵卵器（5% CO<sub>2</sub>） ・遠心機 ・プレートを遠心可能な遠心機（なくてもよい）
- ・抗原3種類、各6本+予備1本（100 μl/well、農場当たり2本使用）

（Nil、PWM、ConA；-20℃保管、使用時に融解し、使い切りにする。）

PWM（Pokeweed Mitogen）およびConA（コンカナバリンA）：リンパ球を抗原非特異的に刺激する物質



上清回収チューブ（回収後、凍結してこのまま返送してください）



抗原（-20℃保管してください）

シール名	抗原
N	Nil（未刺激対照）
P	PWM 5 μg
C	Con A 20 μg

今回送付する資材です

・時間や温度の実施条件を設定していますが、実際に実施していただいた実施条件の記載を別紙（Excel）にお願いします。



（例）

内容	条件	実施条件記載
採血から抗原刺激までの時間	4～6時間	時間
採血から抗原刺激までの保管温度	22±3℃	最高：℃ 最低：℃
血液細胞培養時間	16～24時間	時間
プレート遠心の有無		( ) プレートを遠心した ( ) プレートを遠心していない

# 牛結核病の新しい検査法（インターフェロン・ガンマアッセイ）の条件検討

採血（農場にて）：

対象牛：乳あるいは肉用牛の雌，6カ月齢以上の健康な牛

対象牛ステージ：未経産、2～4歳、4～6歳、6歳以上

農場当たりの頭数：各ステージ5頭くらい計15頭（6歳以上は可能な範囲でお願いします）

農場数：3農場

検体数：15頭×3農場 = 45頭

<注意点：採血はツベルクリン接種前か1週間以上間隔をあけてください。>

1. ヘパリン入り真空採血管を用いて、血液3 ml以上を採取する（採血部位は問わない）。
2. 真空採血管は22±3 °Cで保管する。
3. （検査機関にて）採血から4～6時間後、全血液の抗原刺激を行う。

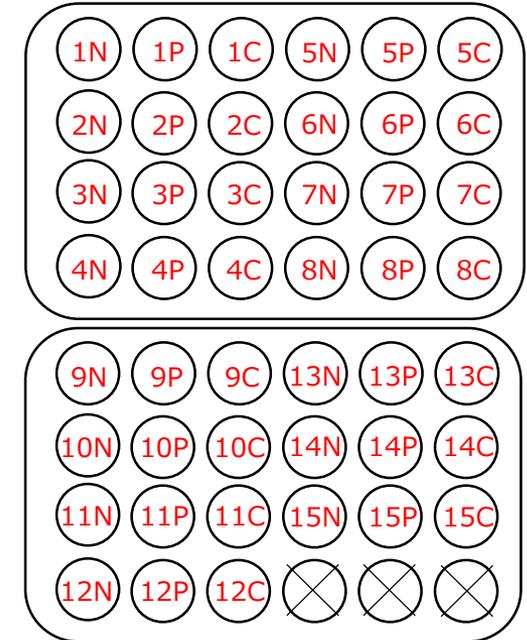
<注意点：血液は3 ml使用します。

白血球の活性は採血後に低下していきますので、採血から抗原刺激までの時間が大変重要です。4～6時間後に設定していますが、できるだけ4時間後をお願いいたします。>

# 牛結核病の新しい検査法（インターフェロン・ガンマアッセイ）の条件検討

## 前処理（検査機関にて）：

1. 真空採血管は $22 \pm 3$  °Cで保管する。
2. 24 wellプレートを用い、採血から4～6時間後、全血液の抗原刺激を行う。  
24 wellプレートの配置は図1の通り。
  - 1) 抗原3種類を農場 あたり2本ずつ融解する。  
全てのウェルに抗原を100  $\mu$ lずつ入れる  
(C→P→Cの順で各抗原ごとに同一チップで分注)。
  - 2) 抗原が乾かないうちに、各個体の真空採血管を素早く10回転倒混和し、  
フタを開けて速やかに全血液を1 ml/well入れる  
(C→P→Cの順で個体ごとに同一チップで分注)。



数値は個体番号, アルファベットは抗原

図1. 1農場分のプレート配置

**コツ①！** ウェル壁上部にチップの先を付けてゆっくり血液を入れる（写真1）。  
チップの先が、入れた血液に触れないようにする。  
触れた場合はチップを交換する。



写真1

- 3) 1プレート全てのウェルに全血液を入れた後、抗原と全血液をよく混和するため、プレートをそっと置いて、水平に保ったままゆっくりと左右に10回ゆする（図2）。
3. 37°C 5%炭酸ガス孵卵器で一晩（16-24時間）培養する。

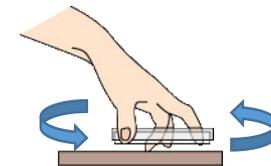


図2

# 牛結核病の新しい検査法（インターフェロン・ガンマアッセイ）の条件検討

## 前処理（検査機関にて）：

4. 上清（血漿）を1.5 mlアシストチューブに回収する。

\*なるべく血球が入らないように回収した上清が200  $\mu$ l以上必要です。

\*プレート遠心機を使用する場合 → Aへ  
しない場合 → Bへ

A. 1) プレートを2,000 rpm、20℃、5分遠心する。

2) 遠心後は血球が傾いているので、プレートを傾けて、血球の少ない側にチップの先を入れてゆっくり上清を吸う（図3）。  
上清を200  $\mu$ lピペットを用いて、同一チップで150  $\mu$ lを2回、計300  $\mu$ lを1.5 mlアシストチューブに回収する。

B. 1) 上清を200  $\mu$ lピペットを用いて、同一チップで150  $\mu$ lを2回、計300  $\mu$ lを1.5 mlアシストチューブに回収する。上清の上部にチップの先を入れてゆっくり上清を吸う。

## <A&B共通>

以下の場合、上清を300  $\mu$ l以上、多めに回収した1.5 mlアシストチューブを13,000rpm、20℃、1分遠心後、血球を吸わないように上清を200  $\mu$ lピペットを用いて150  $\mu$ lを2回、計300  $\mu$ lを新しい1.5 mlアシストチューブに再回収する。

- ①血漿量が少ない場合など、300  $\mu$ lを回収するのが難しい場合は、血球ごと1.5 mlアシストチューブへ回収
- ②回収時に血球をたくさん吸ってしまった場合

**コツ②！** 1.5 mlアシストチューブのふたを開けておいて、プレートは傾けたままキープし、上清を回収する（写真2）。  
もし、血球を吸ってしまった場合は、慌てずにゆっくり吐き出す（写真3）。

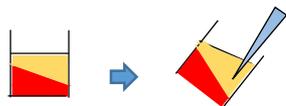


図3.

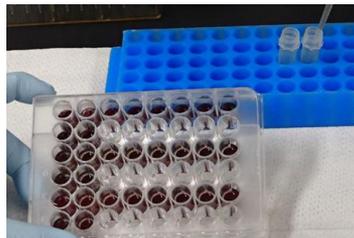


写真2.



血球を吸ってしまった場合・・・ ゆっくり吐き出す

写真3.

5. 回収した上清を-20℃に保存する。

6. 回収した上清を冷凍宅配便（着払い）にて動衛研宛送付する（農場ごとに実施日が異なる場合は都度送付する）。

## 都道府県家畜保健衛生所等における牛結核病本検査マニュアル

牛結核病検査マニュアルにおけるスクリーニング検査（ツベルクリン検査）を実施し、陰性以外の結果が得られた場合には、本検査を実施する。本検査が決定した場合、研究機関（当面は農研機構動物衛生研究部門）は抗原を都道府県家畜保健衛生所等へ配布する。都道府県家畜保健衛生所等において抗原を用いた前処理を実施し、検体を研究機関へ送付する。研究機関は BOVIGAM® を用いて、インターフェロン・ $\gamma$ アッセイを実施する。

### 1. 抗原受領

冷凍便にて、抗原 4 種（N:Nil（未刺激対照）、B:Bovine Tuberculin PPD、A:Avium Tuberculin PPD、P:PWM（抗原刺激陽性対照））受領後、直ちに内容を確認し、使用時まで $-20^{\circ}\text{C}$ 保管する。不備があれば研究機関へ連絡する。

### 2. 準備

以下の資材及び機器を用意する（\*：必須ではない）。

- ・ヘパリン入り真空採血管      ・\*最高最低温度計
- ・24 well 組織培養用プレート      ・1.5 ml チューブ      ・15 ml 遠心管
- ・200  $\mu\text{l}$  ピペット      ・1,000  $\mu\text{l}$  ピペット      ・チューブ立て
- ・炭酸ガス孵卵器（5%  $\text{CO}_2$ ）  
（代用はアネロパック・ $\text{CO}_2$ （A-61 または A-62）及び専用ジャー）
- ・遠心機      ・\*プレートを遠心可能な遠心機

### 3. 農場での採血

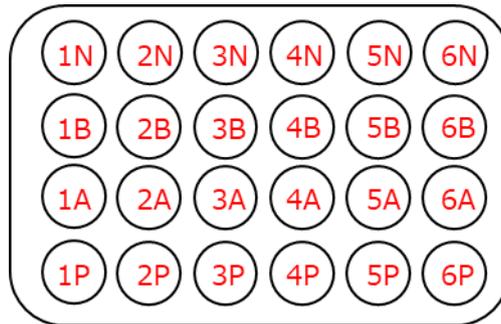
\* 注意事項：1 週間以内のデキサメタゾン注射あるいは 4 週間以内の分娩に該当する個体は、偽陰性の可能性があるため検査対象外とする。

- (1) ヘパリン入り真空採血管を用いて、血液 5 ml 以上を採取する（採血部位は問わない）。
- (2) 採血後は真空採血管を  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  で輸送する。

### 4. 家畜保健衛生所等での前処理

白血球の活性は採血後に低下していくため、採血後出来るだけ早く（4 時間以内が望ましい。6 時間以上の場合は研究機関へ連絡する。）血液の抗原刺激を行う。

- (1) 抗原 4 種類（N、B、A、P）を融解する。1 回で使い切りにする。
- (2) 24 well プレートのウェルに抗原を 100  $\mu\text{l}$  ずつ入れる（N、B、A、P の順で抗原毎に同一チップで分注する）。24 well プレートの配置は下図の通り。個体当たり縦 1 列使用する。



プレート配置（数値は個体の通し番号、アルファベットは抗原）

- (3) 抗原が乾かないうちに、各個体の真空採血管を泡立てないように素早く10回転倒混和し、フタを開けて速やかに血液を1 ml ずつ入れる（ウェル壁上部にチップの先を付けて、チップの先が入れた血液に触れないように静かに血液を分注する）。
- (4) 1 プレート全てのウェルに血液を入れた後、抗原と血液をよく混和するため、プレートを置いて、水平に保ったままゆっくりと左右に10回ゆする（血液が蓋や他のウェルへ移らないように静かに行う）。
- (5) 37 °C 5 %炭酸ガス孵卵器で一晩（16-24 時間）培養する。炭酸ガス孵卵器がない場合は、アネロパック・CO<sub>2</sub>を専用ジャーに入れて通常の孵卵器で代用可能である。
- (6) 真空採血管の残りの血液（1 ml 以上）を15 ml 遠心管等に移し、2,000 rpm、20°C、5分遠心する。上清（血漿）を200 μl ピペットを用いて、同一チップで150 μl を2回、計300 μl を1.5 ml チューブに回収し（回収チューブの名前は、個体の通し番号）、発送するまで-20°Cに保管する。残りの血液が多い場合は300 μl 以上1 ml 以下を回収する。
- (7) 血液細胞培養開始の翌日、プレート遠心機を使用して、プレートを2,000 rpm、20°C、5分遠心し、なるべく血球が入らないように上清（血漿）を200 μl ピペットを用いて、同一チップで150 μl を2回、計300 μl を1.5 ml チューブに回収する（回収時にプレートを傾けて、血球の少ない側にチップの先を入れて静かに吸うようにする）。  
プレート遠心機を使用しない場合、上清（血漿）の上部にチップの先を入れて、より注意深く静かに上清を200 μl ピペットを用いて、同一チップで150 μl を2回、計300 μl を1.5 ml チューブに回収する。  
（チップで吸っている最中に血球を吸った場合、ゆっくり吐き出す。血漿量が少ない場合や回収時に血球をたくさん吸ってしまった場合は、血球毎1.5 ml チューブに回収し、13,000 rpm、20°C、1分遠心し、血球を吸わないように新しい1.5 ml チューブに再回収する。）
- (8) 上清回収チューブの蓋に下記を参照し、名前を記載する。

上清回収チューブの名前は、「○ □」

○：個体の通し番号（1～）

□：抗原名（N, B, A, P）

例）1N：通し番号 No. 1 の抗原 N 刺激

- （9）回収した上清及び前日に回収し-20℃に保管している血漿をその日のうちに冷凍宅配便にて研究機関宛送付するか、あるいは、回収した上清を一度凍結してから、前日に回収し-20℃に保管している血漿と共に冷凍宅配便にて研究機関宛送付する。

## 確定検査実施機関における牛結核病本検査マニュアル

牛結核病検査マニュアルにおけるスクリーニング検査（ツベルクリン検査）を実施し、陰性以外の結果が得られた場合には、本検査を実施する。本検査が決定した場合、研究機関（当面は農研機構動物衛生研究部門）は抗原を都道府県家畜保健衛生所等へ配布する。都道府県家畜保健衛生所等において抗原を用いた前処理を実施し、検体を研究機関へ送付する。研究機関は BOVIGAM<sup>®</sup>を用いて、インターフェロン・ $\gamma$ アッセイを実施する。

### 1. 抗原配布

- (1) Bovine Tuberculin PPD 3000 Stimulating Antigen (REF 7600060) 及び Avian Tuberculin PPD 2500 Stimulating Antigen (REF 7600065) を 110  $\mu$ l と RPMI1640 あるいは PBS 890  $\mu$ l を混合し、最終濃度 Bovine PPD : 300 IU/ml、Avian PPD : 250 IU/ml を作製する。
- (2) 抗原刺激陽性対照として、Pokeweed Mitogen (SIGMA) 5mg を 5 ml RPMI1640 で溶解し、1 mg/ml stock solution を作製する（小分けにして -20~-25 $^{\circ}$ C 保管）。Stock solution を溶解し、55  $\mu$ l と RPMI1640 945  $\mu$ l を混合し、最終濃度 5  $\mu$ g/ml を作製する。
- (3) 未刺激対照として、PBS を 1 ml ずつ分注する。
- (4) 抗原 4 種（N:Nil（未刺激対照）、B:Bovine Tuberculin PPD、A:Avium Tuberculin PPD、P:PWM（抗原刺激陽性対照））は -20 $^{\circ}$ C 保管し、本検査が決定した都道府県家畜保健衛生所等へ必要本数を冷凍便において送付する。

### 2. 試薬の準備

*Mycobacterium bovis* Gamma Interferon Test Kit for Cattle BOVIGAM<sup>®</sup> 2G (Version 4.3\_e) (5 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C 保管) を使用する。

- (1) 使用 30 分以上前に室温 (22 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C) に出す（標識抗体以外）。
  - ・抗 IFN- $\gamma$  抗体固相化マイクロプレート
  - ・牛 IFN- $\gamma$  陽性コントロール
  - ・牛 IFN- $\gamma$  陰性コントロール
  - ・血漿希釈液（緑色）
  - ・洗浄液 (20 $\times$ )
  - ・ペルオキシダーゼ標識抗体 (250 $\times$ ) 常に 5 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C
  - ・標識抗体希釈液（青色）
  - ・発色基質液
  - ・発色停止液
- (2) 陽性及び陰性コントロールは、各 1 ml DW を添加し、泡立てないように静かに混和して、15 分以上置き、完全に溶解する。(4 $^{\circ}$ C 保管で 4 週間、-70 $^{\circ}$ C 保管で数カ月有効)。
- (3) 標識抗体 (250 $\times$ ) は、0.6 ml DW を添加し、泡立てないように静かに混和して溶解する。(5 $\pm$ 3 $^{\circ}$ C 保管で 3 か月有効)

- (4) 洗浄液 (20×) は、析出していたら 37°C で溶解する。DW で 1:19 希釈する。(希釈液は、22±3°C で 2 週間有効)

### 3. 方法

マイクロプレートの配置例

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC	1N	2N	3N	4N	5N	6N	7N	8N	9N	10N	11N
B	PC	1N	2N	3N	4N	5N	6N	7N	8N	9N	10N	11N
C	PC	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B
D	NC	1B	2B	3B	4B	5B	6B	7B	8B	9B	10B	11B
E	NC	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A	10A	11A
F	NC	1A	2A	3A	4A	5A	6A	7A	8A	9A	10A	11A
G	×	1P	2P	3P	4P	5P	6P	7P	8P	9P	10P	11P
H	×	1P	2P	3P	4P	5P	6P	7P	8P	9P	10P	11P

PC:陽性コントロール NC:陰性コントロール N:Nil (未刺激対照)

B:Bovine PPD A:Avium PPD P:PWM (抗原刺激陽性対照)

(数値は牛の通し番号)

- (1) 血漿希釈液 (緑色) 50  $\mu$ l を必要ウェルへ添加する (検体は 2well、コントロールは 3well ずつ使用する)。
- (2) 各ウェルへ血漿及び陽性、陰性コントロールを各 50  $\mu$ l ずつ添加し (コントロールは最後に添加する)、シールして、プレートシェイカーを用いて 1 分間よく混和する。
- (3) プレートシェイカー (600±50 rpm) を用いて、室温 60±5 分間反応させる。
- (4) ウェル内の液を捨て、300  $\mu$ l 洗浄液を満たし、室温で 4 回洗浄する。
- (5) 250 倍に調整 (1:250) したばかりの 100  $\mu$ l 標識抗体を添加し、シールして、プレートシェイカーを用いて 1 分間よく混和する。
- (6) プレートシェイカー (600±50 rpm) を用いて、室温 60±5 分間反応させる。
- (7) ウェル内の液を捨て、300  $\mu$ l 洗浄液を満たし、室温で 4 回洗浄する。
- (8) 100  $\mu$ l 発色基質液を添加し、シールして、プレートシェイカーを用いて 1 分間よく混和する。
- (9) プレートシェイカー (600±50 rpm) を用いて、暗所で室温 30 分間反応させる (最初のウェルへ添加し始めてからの時間)。
- (10) 50  $\mu$ l 反応停止液を添加し、静かに混和する。
- (11) 5 分以内に吸光度計において波長 450 nm で測定する。

### 4. 試験成立条件

陰性及び陽性コントロールの吸光度の平均値の評価

- (1) 陰性コントロール $<0.130$  well間の差が $0.040$ 以上にならないこと。
- (2) 陽性コントロール $1.20\sim 2.00$  well間の差が $30\%$ 以上にならないこと。

## 5. 判定

- (1) 4種類の抗原(N:Nil antigen(未刺激対照)、B:Bovine PPD、A:Avium PPD、P:PWM(抗原刺激陽性対照))で刺激培養した血漿の吸光度の平均値を用いる。
- (2) 陽性=OD Bovine PPD - Nil antigen  $\geq 0.1$  ; and  
OD Bovine PPD - Avian PPD  $\geq 0.1$   
陰性=OD Bovine PPD - Nil antigen  $< 0.1$  ; or  
OD Bovine PPD - Avian PPD  $< 0.1$
- (3) Avian PPDやNil antigenのBovine PPDとのOD値差が $0.100$ 以上の場合、*M. bovis*感染が疑われる。

### \* 注意事項 :

- (1) Nil antigenのOD値が $0.3$ 以上の場合  
*M. bovis*以外の感染が疑われるため、採血から再試験をする。
- (2) PWMのOD値が $0.5$ 以下の場合  
細胞の活性低下が疑われるため、採血から再試験をする。
- (3) 強反応により判定不能の場合  
検体中IFN- $\gamma$ 濃度が高く、Bovine PPD及びAvium PPDが共にOD値 $3.5$ を超えた場合、Nil(採血当日に回収した培養の残りの血液を遠心して得られた血漿)を用いて検体を希釈する。PPD:Nil(1:2)血漿を希釈して再試験する。さらに $3.5$ を超えた場合、PPD:Nil(1:4)血漿を希釈して再試験する。判定可能となるまで希釈して再試験する。

参考 : BOVIGAM®2G ver. 4.3\_e(Thermo Fisher Scientific Prionics AG)

## 研究推進会議の開催状況、研究成果の発表(論文、特許等)等

試験研究課題名	インターフェロンγアッセイ法を用いた牛結核病の診断法の導入
---------	-------------------------------

課題 番号	(1) 研究推 進会議 等開催 回数	(2) 行政が 活用し うる成 果の有 無	(3)学術論文数		(4)口頭発表回数		(5) 出版 図書数	(6)国内特許権等数		(7)国際特許権等数		(8) 報道 件数	(9) 物品購 入の有 無
			和文	欧文	国内	国際		出願	取得	出願	取得		
3102	2	有	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	無

## (1)研究推進会議等の開催実績

区分:①推進会議、②現地検討会、③その他

区分	推進会議の名称	年月日	開催場所	参加者 数	消費・安全局担当 官の出席有無	主な議題及び決定事項
①	平成31年度安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業 研究推進会議(設計会議)	2019.6.13	農林水産省消費・安全局	12	有	研究課題名「インターフェロンγアッセイを用いた牛結核病の診断法の導入」研究目的、計画の説明と意見交換
①	平成31年度安全な農林水産物安定供給のためのレギュラトリーサイエンス研究委託事業 研究推進会議	2020.2.4	農林水産省消費・安全局	13	有	研究課題名「インターフェロンγアッセイを用いた牛結核病の診断法の導入」事業報告と意見交換

(2) 行政が活用しうる成果

区分: ①行政がすでに活用した成果、②行政が活用する目途がたった成果

区分	成果の内容	主な利用場面	活用状況
②	牛結核病の新たな診断法の確立	都道府県家畜保健衛生所等における牛結核病の摘発	農林水産省において家畜伝染病予防法施行規則で規定する牛結核病の確定診断法に盛り込む方向で検討中

(3) 学術論文

タイトル、著者名、学会誌名、巻、ページ、発行年月	機関名

(4) 口頭発表

タイトル、発表者名、学会等名、発表年月	機関名

(5) 出版図書

区分: ①出版著書、②雑誌、③年報、④広報誌、⑤その他

区分	著書名、(タイトル)、著者名、出版社名、発行年月	機関名

(6)国内特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(7)国際特許権等

特許権等の名称	発明者	権利者 (出願人等)	特許権等の種類	番号	出願年月日	取得年月日	機関名

(8)報道件数

区分:①プレスリリース、②新聞記事、③テレビ放映

区分	記事等の名称	掲載紙・放送社名	年月日	機関名	備考

(9)購入物品

品名	規格	員数	購入実績(円)		使用目的	備考
			単価	金額		