

ヨーネ病検査マニュアル

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構
動物衛生研究部門

	ページ
1. 疫学調査	1
2. 臨床検査	1
3. 細菌学的検査	
I. 糞便塗抹検査	1
II. ヨーネ菌分離培養検査	
(1) 糞便の処理方法	1
(2) 寒天培地を用いるヨーネ菌培養検査	2
(3) 液体培地を用いるヨーネ菌培養検査	4
(4) ヒツジ糞便等からヨーネ菌を分離培養する際の注意点	5
III. ヨーネ病遺伝子検査（糞便中のヨーネ菌 DNA の検出）	6
IV. 病理切片からの抗酸菌 DNA 抽出	14
4. 免疫学的検査	14
5. 病理学的検査	15

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

I. 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

II. ヨーネ菌分離培養検査

(1) 糞便の処理方法

- 1) 糞便 1 g を 20 ml 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 5 ml を 20 ml の 0.75%ヘキサデシル[®]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) 900 g で 30 分間遠心し (低温で遠心すると HPC が析出するため、25℃ 前後で)、上清を捨て、沈殿物を 1 ml 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、ブリストル製薬 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 培地で作製すると、完全に透明にはならず少しずつ濁ってくるため、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 培地で作製後、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 培地で調製し、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)

(2) 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、1 mg / ml)	2 ml	3 ml	6 ml
5) 2 % Malachite green in DW (高压滅菌)	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 (10 ml / 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 カ月以上行う。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ため、可能であれば 5 カ月間培養を続ける。

3. 判定方法

- (1) 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。
- (2) 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。
- (3) ヨーネ菌同定用 PCR 検査

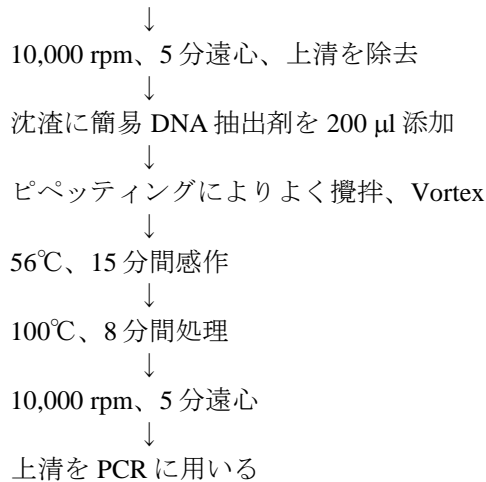
1) 準備

- 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' GGCACGGCTCTTGTGTAGTCG 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

2) 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



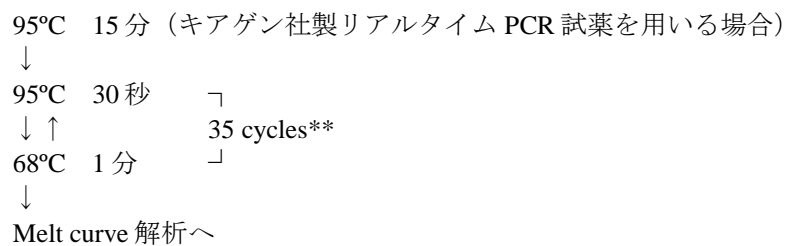
3) PCR

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、12 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ため、検査はリアルタイム PCR により実施する。

**定量解析が必要な場合は、11 ページを参照し、45cycles とする。

(4) LAMP 法によるヨーネ菌の同定

1) 準備

- a) LAMP 法用プライマーセット ヨーネ菌 (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)
- b) 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)
- c) 簡易 DNA 抽出剤 (BioRad 社、InstaGene®等)
- d) 滅菌蒸留水、マイクロピペット、フィルター付きチップ等

2) DNA の抽出

3 ページ 3 (3) 2) の方法に従って DNA を抽出する。

3) 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
<i>Bst</i> DNA Polymerase	1
Fluorescent Detection Reagent Map	1
D.W.	3
菌由来 DNA 液	5
<hr/>	
Total	25

LAMP 法温度条件

66°C 45 分
↓
80°C 5 分
↓
蛍光を目視判定

(3) 液体培地を用いるヨーネ菌培養検査

1. 培地の準備

(1) 液体培地 : BD BACTEC MGIT Para TB Medium®

(ベクトンディッキンソン社、Code: 245154 受注発注品)

*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を間接的に確認できる。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、増殖した菌がヨーネ菌か否かの同定試験が必須である。

(2) 培地添加剤 :

1) BD BACTEC MGIT Para TB Supplement®

(培地添加剤 ; ベクトンディッキンソン社、Code: 245156 受注発注品)

- 2) 50% 卵黄液 (アテクト製等)
- 3) Vancomycin (Sigma V-2002 等)
- 4) Nalidixic acid, sodium salt (Sigma N-4382 等)
- 5) Amphotericin B (ファンギゾン、ブリストル製薬 KK 等)
- 6) 滅菌蒸留水

(3) 培地作製法：
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
Para TB 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℃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℃保存

2. 培養及び判定方法

- 1) 抗生物質処理糞便浮遊液 0.1 ml を培地添加剤を添加した液体培地に接種する。接種後培養チューブをよく転倒混和し 37℃で培養する。
- 2) 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。（蛍光を観察するために、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ので、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。
- 3) 何も接種しない液体培地のコントロールを少なくとも 1 本は作製し、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 12 週間培養を続け、最終的な菌増殖の有無を判定する。
- 4) 抗酸菌染色：培養チューブ底部の卵黄液層より培養液を 100 µl 採取する（チューブは転倒混和しないこと）。滅菌生理食塩水 150 µl を加えてピペッティングにより良く混和後、スライドガラスへ塗抹、風乾、火炎固定する。定法に従って抗酸菌染色を実施し、抗酸菌の有無を確認する。ヨーネ菌の同定には遺伝子検査が必要。
- 5) ヨーネ菌の同定：蛍光を発した液体培地（あるいは抗酸菌確認後でもよい）から培養液を採取し、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：

- ① 液体培地を良く攪拌後、170 µl（培地の 1/50 量に相当）採取する。100℃、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。ただし、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。
- ② リアルタイム PCR 検査は、2 ページの 3 (3) ヨーネ菌同定用 PCR 検査に従って実施する。

(4) 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ため、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。

III. ヨーネ病遺伝子検査（糞便中のヨーネ菌 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 コピー存在するため（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ため、特異的反応と非特異反応を区別するために解離温度解析（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。二本鎖 DNA はその塩基配列により Tm 値（二本鎖 DNA の半分が一本鎖に解離する温度）が決まるため、PCR 後に反応液の温度を少しずつ上昇させ、二本鎖が一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℃付近から一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）。

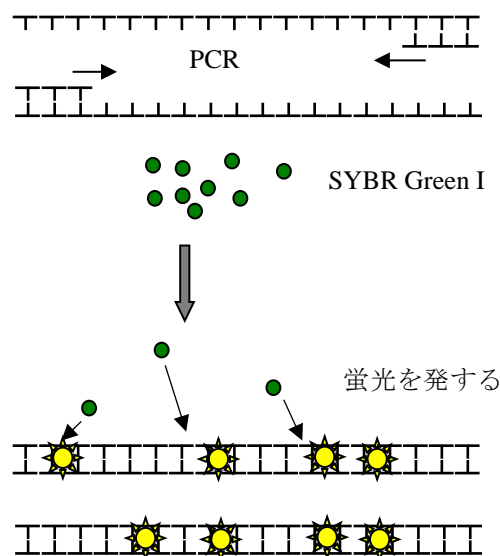


図 1. SYBR Green I インターカレーター法

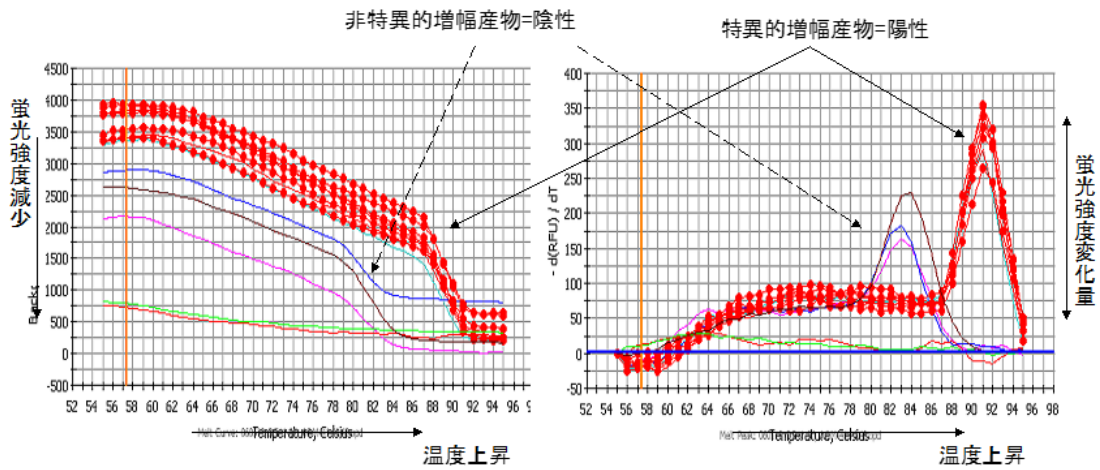
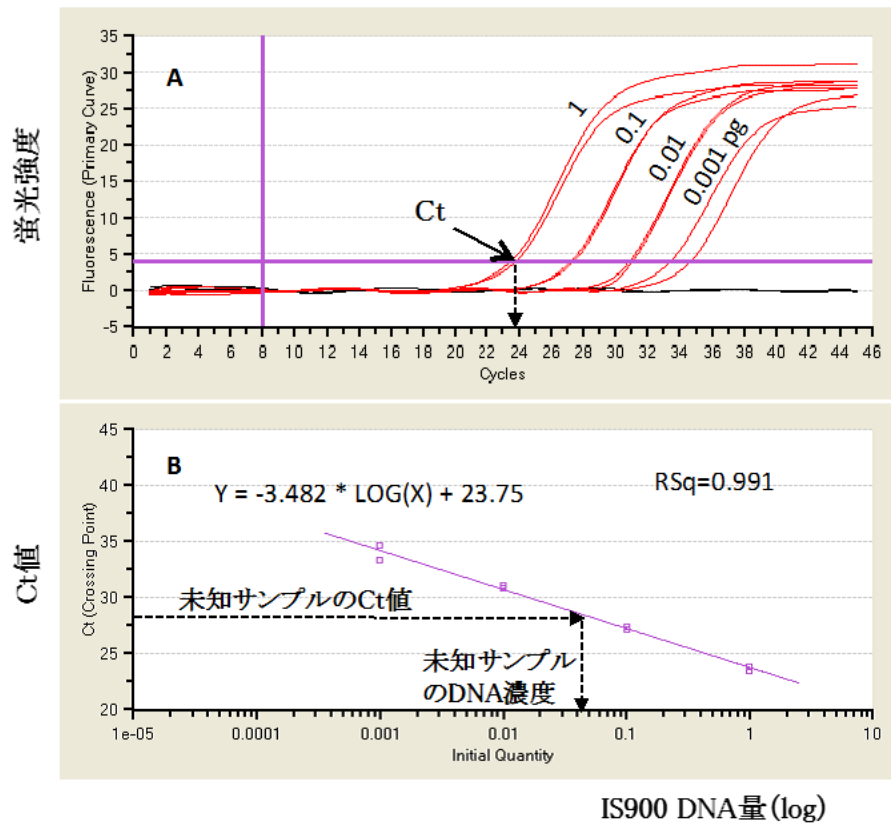


図2. 融解曲線解析による特異性の検討
 左図：温度上昇により解離温度に達すると蛍光強度が低下する。
 右図：上記のデータを一次微分した結果



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) ヨーネ菌 DNA 抽出キット、「ヨーネスピ[®]ver2」（(株)ファスマック）
- 3) ヨーネ菌 DNA 抽出キット、「ヨーネファース[®]」（共立製薬(株)）
- 4) ヨーネ菌 DNA 抽出キット、「ヨーネ・ピュアスピン」（(株)ファスマック）
- 5) 滅菌蒸留水、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
アプライドバイオシステムズ	ABI7300
	ABI7500
	ABI7500Fast
	ABI7900HT
	StepOnePlus
	QuantStudio 3/5
ロシュダイアグノスティック	LightCycler 480 II
	LightCycler 96
	LightCycler Nano
バイオ・ラッドラボラトリーズ	iCycler
	Chromo4
	CFX96
アジレントテクノロジー	Mx3000p
タカラバイオ	DiceTP800

- 2) ビーズ式破碎装置

抽出キットにより使用可能装置および破碎条件が異なるので注意すること。

- ・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（安井器械株式会社）
 - ・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
- 3) 1.5 ml マイクロチューブ（DNA 低吸着チューブ）
 - 4) ピペット、マイクロピペット、チップ（フィルター及び目盛り付き）等
 - 5) PCR 用 96-well プレート及びキャップ（あるいはシール）
 - 6) 遠心分離機（最高速度が 20,000×g 未満の機種については、最高速度で遠心分離を行い、遠心時間は以下の式を参考に算出する。

$$\text{遠心時間 (分)} = \frac{\text{プロトコール指定の遠心加速度 (×g)} \times \text{プロトコール指定の遠心時間 (分)}}{\text{実際の遠心加速度 (×g)}}$$

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。

- ・ヨーネ菌 DNA 抽出キット、「ヨーネスピ[®]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))
- ・ヨーネ菌 DNA 抽出キット、「ヨーネ・ピュアスピ[®]」(株)ファスマック)

1) ヨーネスピ[®]ver2 を用いる糞便からの DNA 抽出

1. 牛糞便 1g を 20 ml の滅菌蒸留水、あるいは滅菌生理食塩水で希釈し、(あるいは牛糞便重量を計測し、その 20 倍量の滅菌蒸留水または滅菌生理食塩水で希釈し、) 激しく混合攪拌した後、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(20,000×g、5 分間、室温)した後、ビーズを吸わないように上清を除去する。
3. 600 μl の抽出液 I 及び 6 μl の酵素液を添加する。
4. ビーズ式破砕機に 3. のチューブをセットし、良く破砕する(破砕条件は下記の付記 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(13,000×g、60 秒間、室温)により気泡を落とすとしても良い。
6. 75 μl の抽出液 II を添加し、直ちに 10 ~ 12 回チューブを転倒し、よく混和する。
7. 遠心(20,000×g、10 分間、室温)する。
8. 400 μl の吸着液 III と上清 500 μl とを新しい 1.5 ml チューブで完全に均一になるまでよく攪拌混合(ピペッティングあるいは転倒混和後スピ[®]ンダウン)する。
注) 吸着液 III は、あらかじめチューブに分注しておくことも可能。
9. 8. の混合液 900 μl を スピ[®]ンカラム に移し、遠心(13,000×g、60 秒間、室温)し、濾液は廃棄する。
10. 600 μl の洗浄液 IV を 9. で使用したスピ[®]ンカラム に添加した後、遠心(13,000×g、60 秒間、室温)する。
注) 遠心後、洗浄液 IV がカラム内に残っている場合は、再遠心して完全に除去する。
11. スピ[®]ンカラムを新しい 1.5 ml マイクロチューブに移す。
12. 50 μl の溶出液 V をスピ[®]ンカラムに滴下した後、3 分間室温で静置する。
13. 遠心(13,000×g、60 秒間、室温)し、濾液を回収する。

2) ヨーネファース[®]を用いる糞便からの DNA 抽出

全ての操作は室温(1~30℃)で行う。

1. 新鮮または凍結糞便サンプルを準備する。糞便約 1g を 50 ml の遠心管に採取し、20 倍量の滅菌蒸留水を添加、ボルテックスミキサーなどで、激しく攪拌混合後、室温で 30 分間静置する(懸濁液)。
2. 懸濁液上清 1 ml をビーズチューブに添加する。
3. 20,000×g、2 分間遠心、その上清を除去し沈殿を得る。
4. 3. のビーズチューブに Buffer A を 300 μl 添加し、攪拌混合(ボルテックス)する。
5. ビーズ破砕機を用いて 4,600 rpm で 3 分間破砕処理を行う(破砕条件は下記の付記 1. 参照)。
6. 遠心(スピ[®]ンダウン)後、Buffer B を 300 μl を添加し加えて速やかに激しく転倒攪拌混合する。
7. 20,000×g、5 分間遠心する。
8. 遠心中に新チューブ(別売)を準備して Buffer C を 450 μl ずつ分注しておく。スピ[®]ンカラムも必要数準備しておく。
9. 8. で準備した Buffer C 分注済みのチューブに、遠心上清 450 μl を添加して完全に均一になるまでよくピペッティングし、その全量をカラムに添加する。
注) 以後の抽出操作は速やかに行ってください。
注) 凝集物ができた場合、凝集物を含めすべてカラムへ添加してください。
10. スピ[®]ンカラムの蓋を閉め、15,000×g、1 分間遠心する。遠心機からスピ[®]ンカラムとコレクションチューブを注意深く取り出す。コンタミネーションに注意してコレクションチューブ内の濾液を廃棄し、スピ[®]ンカラムに再装着する。

- 注) 遠心後に混合液がカラム内に残っている場合は、最高速度で再度遠心操作を行ってください。
11. 注意深くスピнкаラムの蓋を開け、スピнкаラムに Buffer D を 500 μ l 添加する。
 12. スピнкаラムの蓋を閉め、15,000 \times g、1 分間遠心する。遠心機からスピнкаラムとコレクションチューブを注意深く取り出し、スピнкаラムを新しいサンプリングチューブ (別売) に装着する。濾液の入ったコレクションチューブは廃棄する。
注) 遠心後 Buffer D がカラム内に残っている場合は、再度遠心操作を行ってください。
注) Buffer D が残余すると回収率が悪くなる場合があります。また、溶出液に混入すると遺伝子増幅反応を阻害するので注意してください。
 13. 注意深くスピнкаラムの蓋を開け、スピнкаラムの中央に Buffer E を 50 μ l 添加する。
注) カラム壁面ではなく、ディスク上に直接添加してください。
 14. スピнкаラムの蓋を閉め、15,000 \times g、1 分間遠心する。遠心機からスピнкаラムとサンプリングチューブを注意深く取り出し、サンプリングチューブ内の溶出液を回収する。
注) スピнкаラムに添加した溶出用 Buffer E は、ほぼ全量が回収されます。
注) 回収したゲノム DNA をすぐに使用しない場合は、 -20°C 以下で保存することをお勧めします。

(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
・ファーストプレップ	6 m/sec	90 秒 (45 秒 \times 2)
・プリシリーズ 24	5,000 rpm	90 秒 \times 2 回

3) ヨーネ・ピュアスピン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、(あるいは牛糞便重量を計測し、その 20 倍量の滅菌蒸留水または滅菌生理食塩水で希釈し、) 激しく混合攪拌した後、30 分間静置する (牛糞便懸濁液)。
2. 2.0 ml チューブ (ビーズチューブ) に 1. の牛糞便懸濁液の上清 1.0 ml を移し、遠心 (20,000 \times g、5 分間、室温) した後、ビーズを吸わないように上清を除去する。
3. 400 μ l の抽出液①-A 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 2. 参照)。
5. 遠心 (20,000 \times g、5 分間、室温) し、上清を新しい 1.5 ml チューブへ移す。この際、多少ビーズを吸っても構わないので、上清はできるだけ多く回収する。
6. 200 μ l の抽出液①-B を添加し、よく混和する。
7. 75 μ l の抽出液②を添加し、直ちに 10~12 回チューブを転倒し、よく混和する。
8. 遠心 (20,000 \times g、10 分間、室温) する。
9. 上清 500 μ l を新しい 1.5 ml チューブに移す。
10. 400 μ l の吸着液③を添加し、よく混和する (ピペッティングあるいは転倒混和後スピンドウン)。
11. 10. の混合液 900 μ l をスピнкаラムに移し、遠心 (13,000 \times g、60 秒間、室温) する。その後、スピнкаラムを新しいコレクションチューブにセットする。
12. 600 μ l の洗浄液④を 11. で使用したスピнкаラムに添加した後、遠心 (13,000 \times g、60 秒間、室温) する。
注) 遠心後、洗浄液④がカラム内に残っている場合は、再遠心して完全に除去する。
13. スピнкаラムを新しい 1.5 ml チューブにセットする。
14. 50 μ l の溶出液⑤をスピнкаラムに滴下した後、3 分間室温で静置する。
15. 遠心 (13,000 \times g、60 秒間、室温) し、濾液を回収する。

注) 抽出液①-B および吸着液③については、あらかじめチューブに分注しておくことも可能

(付記 2.) ビーズ式破碎装置及び処理時間：

・マルチビーズショッカー	4,000 rpm	2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
・ファーストプレップ	6 m/sec	90秒 (45秒×2)

(2) 「ヨーネジーン・KS」を用いるリアルタイム PCR 検査
(QuantiTect SYBR Green PCR Kit (キアゲン社) を用いる場合は、2 ページ 3 (3) ヨーネ菌同定用 PCR 検査を参照する。)

1) 反応液の調製

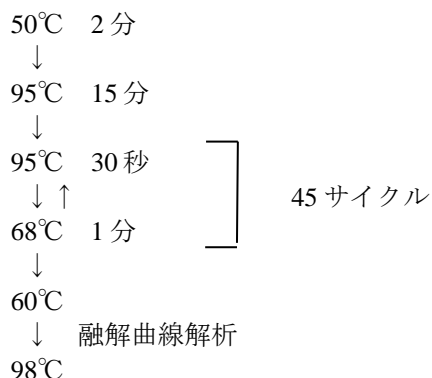
① 1 サンプルあたり以下のように反応液を調製する。

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

- ② 指示陽性 DNA を TE 緩衝液を用いて、指示陽性 DNA 10 µl に対し TE 緩衝液 90 µl の割合で混合し、1 pg / 2.5 µl ~ 0.001 pg / 2.5 µl まで 10 倍階段希釈する。このとき、TE 緩衝液 90 µl の分注には、容量 100 µl ~ 200 µl のピペットチップを用い、指示陽性 DNA の分注には容量 10 µl のピペットチップを用いる。ピペッティング容量を 50 ~ 90 µl として、泡立て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 µl に糞便抽出 DNA 液を 5 µl 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 µl ずつ 2 穴に、0.2 ml PCR 用チューブを用いる場合は 1 本あたり 25 µl ずつ 2 本に分注する。
- ④ 各希釈指示陽性 DNA 液 5 µl を反応液 45 µl に添加し、よく攪拌後、25 µl 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 µl 添加した反応液を 25 µl 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の自動設定で行う。

試験成立条件：

- ① 指示陽性 DNA の原液（濃度 1 pg / 2.5 μl）におけるスレッシュホールド・サイクル（Cycle of threshold; Ct）値が 24±3 サイクルであり、指示陽性 DNA の 1,000 倍希釈液（濃度 0.001 pg / 2.5 μl）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
アプライドバイオシステムズ	ABI7300	87.0°C±1.5°C
	ABI7500	
	ABI7500Fast	
	ABI7900HT*	
	StepOnePlus	
	QuantStudio 3/5 *	
ロシュダイアグノスティック	LightCycler 480 II	88.0°C±1.5°C
	LightCycler 96 *	
	LightCycler Nano *	
バイオ・ラッドラボラトリーズ	iCycler	91.0°C±1.5°C
	Chromo4	87.0°C±1.5°C
	CFX96	86.5°C±1.5°C
アジレントテクノロジー	Mx3000p	88.8°C±1.5°C
タカラバイオ	DiceTP800	87.0°C±1.5°C

*：動衛研で解離温度を確認したリアルタイム PCR 機種

- 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 0.001 pg / 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。ヨーネ菌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（指示陽性調整液を用いた用量-反応式からヨーネ菌 DNA 濃度を計算し、検体調整液 0.025 cc 中の DNA 量が 0.001 pg 以上と判定された検体を陽性とし、それ以外の検体を陰性とする。）に従って行う。

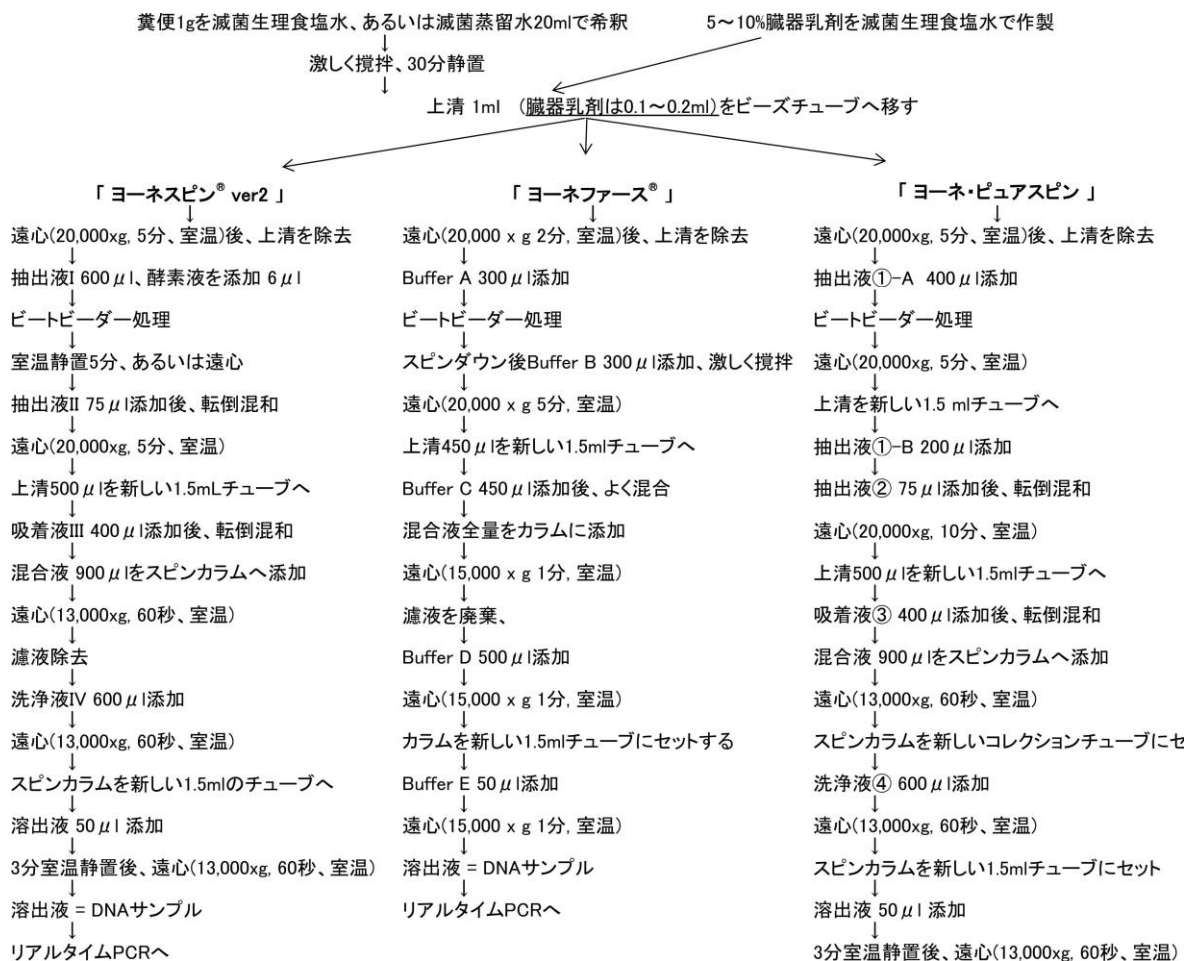
4. ヨーネ病検査の精度管理（糞便からの DNA 抽出法の精度管理）

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（動衛研から供給）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。

糞便・臓器乳剤からの DNA 抽出・精製法（フローチャート）



IV. 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 μm) 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. 市販ヨーネ菌 DNA 抽出キットによる DNA 抽出

脱パラフィン後、DNA 抽出を行う。

- 1) 薄切した (5~10 μm) 組織切片 1~5 枚
↓
- 2) キシレン 1ml 添加、Vortex、37°C 5 分
↓ ↑ } ×2 回
- 3) 12,000 rpm、5 分遠心、上清除去
↓
- 4) 100%エタノール 1 ml 添加、Vortex
↓ ↑ } ×2 回
- 5) 12,000 rpm、5 分遠心、上清を除去

6) 市販ヨーネ菌 DNA 抽出キットのビーズチューブへ移し、9~10 ページ 3 (1) のヨーネ菌 DNA 抽出キットのプロトコールに従う。

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.

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
腸間膜リンパ節の髓様腫脹

(2) 病理組織学的検査

粘膜固有層、粘膜下織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 10 cm 位上
2. 回盲部から 30 cm 上
3. 回盲部から 50 cm 上
4. 回盲部から 1 m 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 10 cm 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 50 ml 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。