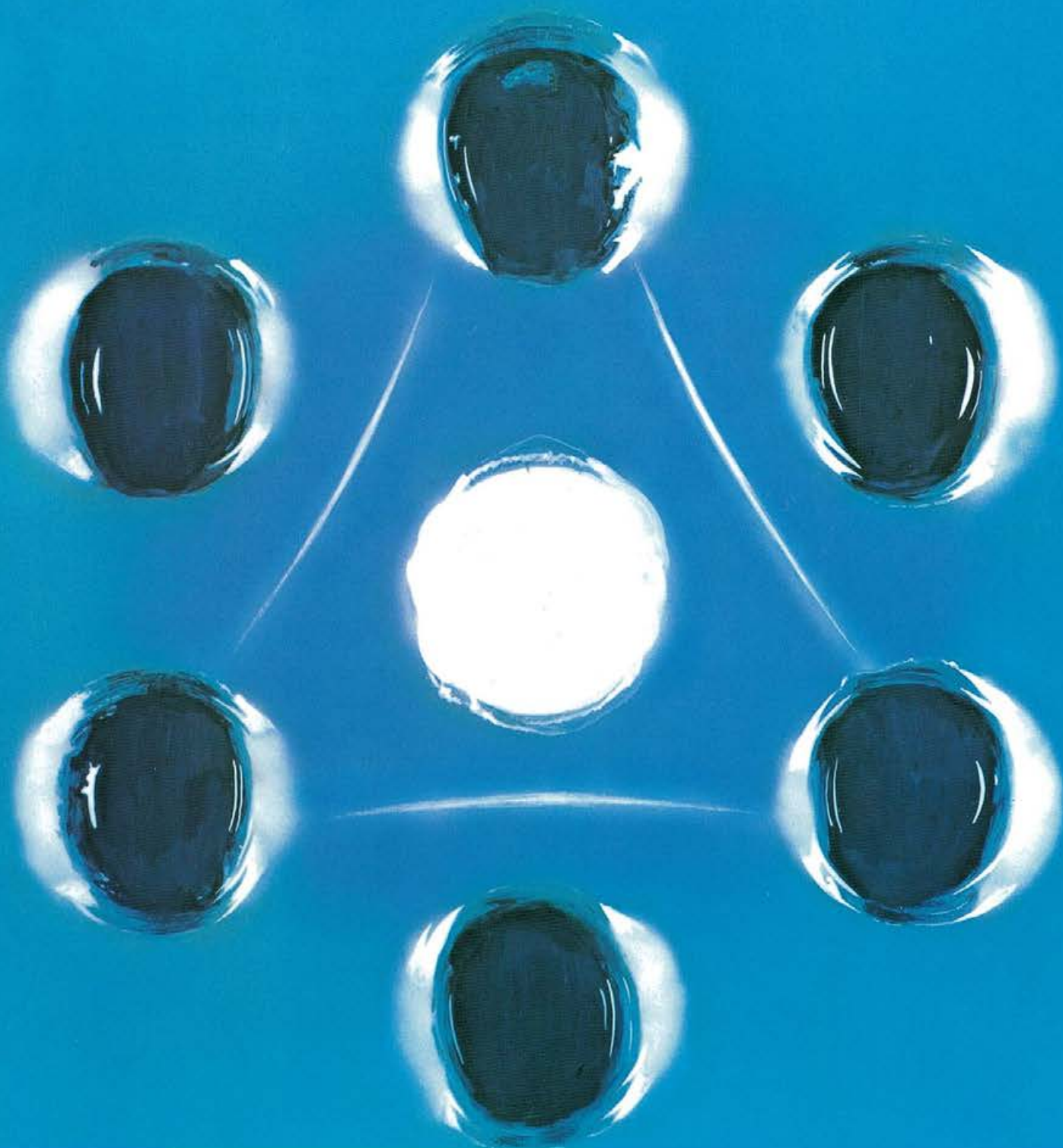


馬伝染性貧血の診断術式

社団法人 中央畜産会



目次

はじめに	1
寒天ゲル内沈降反応とエライザ	2
I. 寒天ゲル内沈降反応の術式	3
1. 器材の準備	3
2. 反応の実施	4
3. 判定および記録	4
4. 記録用紙	5
5. 判定基準	6
II. エライザの術式	9
1. エライザ用キットの構成	9
2. 試薬類の保存方法	9
3. 器材の準備	10
4. 反応の実施	11
5. 判定基準	15
あとがき	16

はじめに

馬伝染性貧血（以下伝貧と略す）は、馬属にのみ認められるウイルス性の伝染病で、このウイルスに感染すると、40～42℃におよぶ高熱の繰り返し、重度の貧血、四肢および前胸部から下腹部の冷性浮腫、元気や食欲の減退あるいは消失などの症状を呈して、重症例では斃死することもある。通常認められている症例では、慢性に経過し、生涯に渡りウイルスを体内に保持し続け、他の馬への感染源となる。したがって、本病はわが国の馬産業にとっては極めて重大な疾病として扱われ、その防遏に多大な努力が払われてきた。

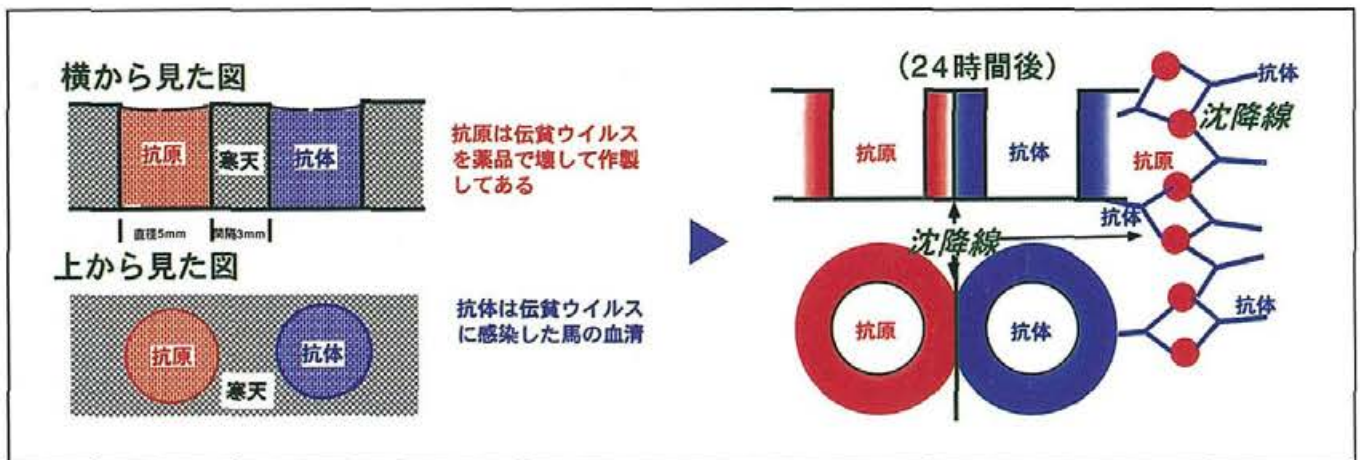
そのような状況の中で、1971年に中島らにより、伝貧ウイルスに対する特異抗体を検出する寒天ゲル内沈降反応が開発された。この方法は、従来の担鉄細胞や貧血をもとにした臨床的な診断法に代わる画期的な方法として、世界的に導入された。わが国でも、1978年に家畜伝染病予防法に採用され、本病の防遏に多大な貢献を果たした。本方法の導入により、導入当初は多数の感染馬が摘発されたものの、その後減少し、その発生は1983年以降途絶えていた。しかし、1993年に法改正以降まったく検査を行っていなかった肉用馬の生産牧場で2頭の発生があったものの、その後の発生は認められていない。一方、諸外国では、わが国のように診断・淘汰主義を導入していない国も多く、それらの国々では相変わらず発生が続いていることから、輸入馬を通してわが国に侵入する可能性は無いとはいえ、国内でも定期的な検査が必要な状況は依然として続いている。一方、寒天ゲル内沈降反応は、判定までに24時間以上が必要であることから、入厩検査に本方法を応用する場合には、この間入厩馬を検疫厩舎に隔離する必要があった。しかし、この隔離時間は、特に調教の進んだ競走馬にとっては大きなストレスとなるばかりでなく、調教スケジュールに影響を与えることもしばしば指摘されてきた。そこで、競走馬総合研究所栃木支所では、より短時間に特異抗体を検出する方法を模索した結果、エライザ法を確立した。また、メーカーとも共同でシステムを開発し、日本中央競馬会の入厩検査に、本病のスクリーニング法として採用した。この方法を使うことにより、午前中に検疫厩舎に入厩した馬は、午後3時に開放されることが可能となった。また、地方の競馬場では入厩検査厩舎の有効利用が可能となり、入厩検査が可能な馬の数が倍増した。

寒天ゲル内沈降反応とエライザ

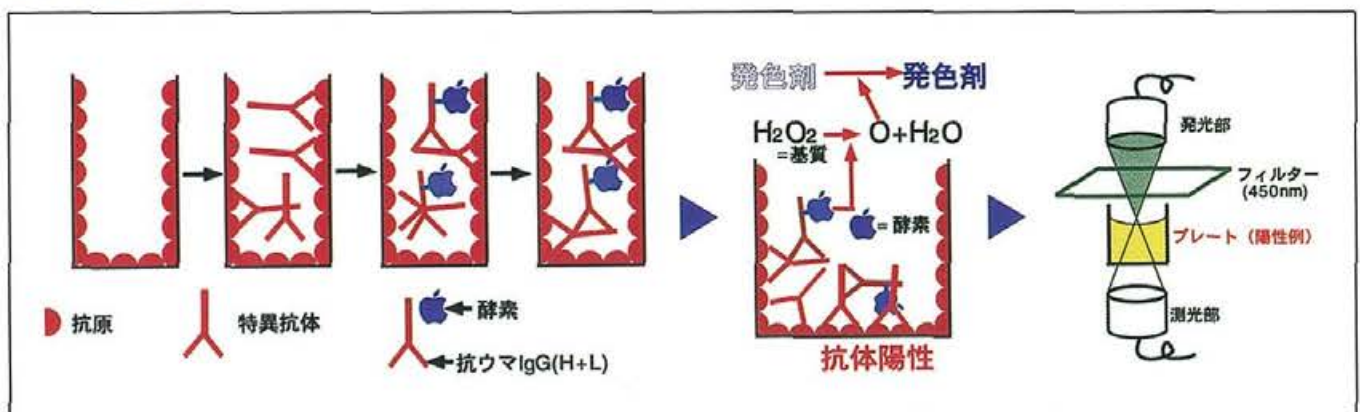
寒天ゲル内沈降反応では、寒天の平板に3mm間隔で2つの穴（直径5mm）をあけ、それぞれに、ウイルス由来の抗原と感染馬血清を入れる。しばらく放置すると、両者はゲルの中を拡散して、会合する。出会った両者は、抗原抗体反応を起こして、沈降線が形成される。この沈降線は、暗室で斜めに光りをあてると白い線として観察することが出来る。一方、エライザでは、抗原をプラスチックの表面に結合させ、その上で抗原抗体反応を起こさせ、抗原に結合した抗体を、酵素を使った系で検出する。反応は瞬時に起こるので、寒天ゲル内沈降反応と比べると数分の一の時間で結果を出すことが出来る。しかし、エライザでは伝貧ウイルスと反応した抗体と、不純物に対する抗体を区別す

ることが難しいことから、抗原がよほど純粋でないとい誤った結果をだすことがある。一方、寒天ゲル内沈降反応は、この両者を区別することが容易であり、特異性の点では、エライザと比較するとはるかに優れている。現在の家畜伝染病予防法では、伝貧の診断は寒天ゲル内沈降反応で行うことが定められているので、エライザはあくまでスクリーニング法の一つであり、最終診断は寒天ゲル内沈降反応で行わなければならない。しかし、エライザは、寒天ゲル内沈降反応と比べると迅速性の点で勝っており、両者を組み合わせることにより、伝貧の迅速かつ確実な診断を行うことが可能となる。

寒天ゲル内沈降反応の原理



エライザの流れ



I

寒天ゲル内沈降反応の術式

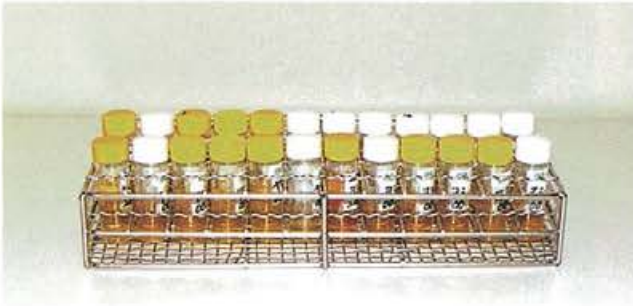
1

器材の準備



市販抗原

抗原および標準血清がセットで市販されている。一箱で40検体の検査が可能である。開封前は冷蔵庫に、開封後は冷凍庫に保存するのが好ましい。



血清材料

多検体の検査を行う場合には、材料の入れ間違えを防ぐために、12本ずつ並べるなどの工夫が必要である。

また、凍結してあった材料を検査する場合には、転倒混和して十分に混合する。



通常は室温で反応させるが、寒冷地では30℃前後に保温することが好ましい。



寒天ゲル内沈降反應用市販プレート

スライドガラスで自作することも可能である。一枚のプレートで12検体の検査が可能である。冷蔵されていたプレートは室温に数10分放置してから使用する。反応孔に液体が入っていることがあるので、事前にスポイトなどで吸い取る。



分注用器材

反応孔には1穴あたり約50 μ lの抗原、標準血清あるいは血清試料が入るので、写真のような器材を準備する。



イムノビューアー

下から斜めに光をあけると沈降線が浮かび上がって見える。暗室で観察すると良い。



- 1) 5頁の判定用紙に示す順番に血清材料を寒天の表面と同じ高さまで、あふれさせないように入れる。手先が震えないように一方の手で支えると、材料を入れやすい。寒天を傷つけたり、他の所に垂らしたりしたら、そのブロックやプレートは廃棄する。



- 2) 標準陽性血清をPS、抗原をAGの位置に入れる。



- 3) 材料が4の倍数でない場合には、かならず空いた穴に同じ材料などを入れて、空の反応穴を作らない。



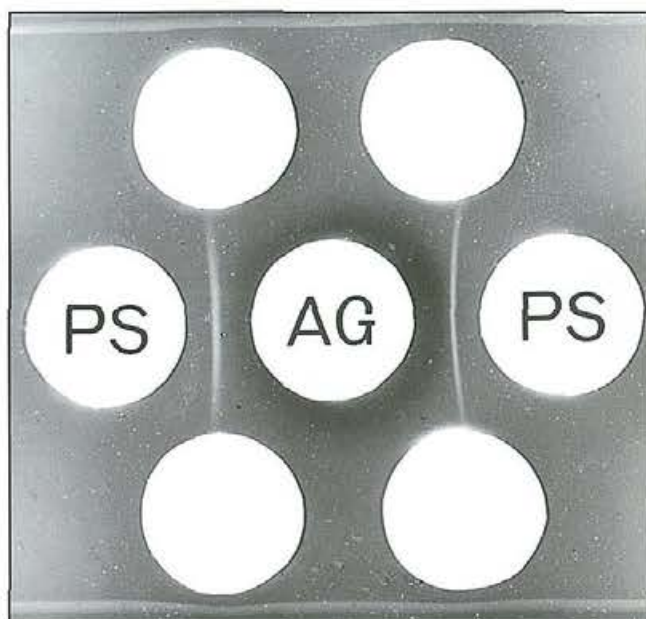
- 4) 密閉できる反応箱に入れる。試料が少ない場合には、乾燥防止のために水を含ませた脱脂綿などを一緒に入れる。

伝染病予防法施行規則では、24時間から96時間反応させてから判定することが定められている。沈降線の観察は、イムノビュアを使って、暗室で行う。特に、抗原と標準陽性血清との間に形成される標準沈降線の

確認が重要である。また、反応および判定の実施日、時間、術者、判定者、抗原および反应用プレートのロット番号などをかならず記載し、後日の証拠として残すことを心がける。

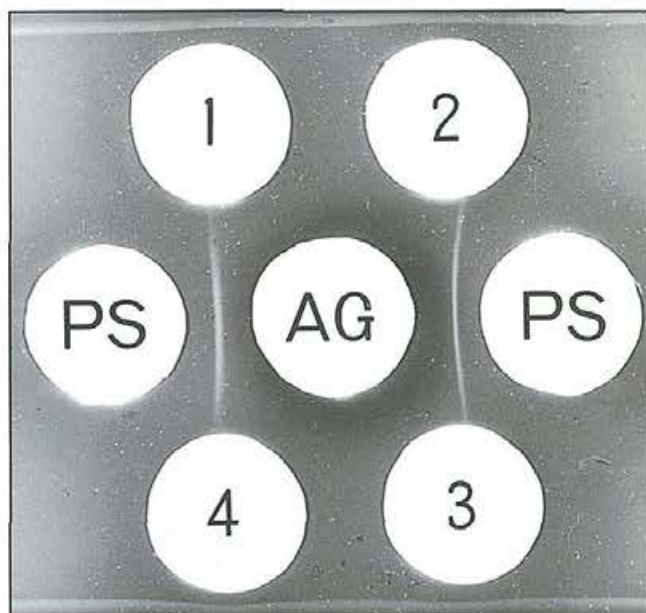
プレート番号				材 料			
1	2	5	6	9	10		
PS	AG	PS	PS	AG	PS	PS	PS
4	3	8	7	12	11		
1 _____	2 _____	3 _____	4 _____	5 _____	6 _____	7 _____	8 _____
9 _____	10 _____	11 _____	12 _____				
術 者 _____				判定者 _____			
反応日 年 月 日 時				判定日 月 日 時			
				ロット番号 _____			
				診断キット _____			
				ゲル沈プレート _____			

プレート番号				材 料			
1	2	5	6	9	10		
PS	AG	PS	PS	AG	PS	PS	PS
4	3	8	7	12	11		
1 _____	2 _____	3 _____	4 _____	5 _____	6 _____	7 _____	8 _____
9 _____	10 _____	11 _____	12 _____				
術 者 _____				判定者 _____			
反応日 年 月 日 時				判定日 月 日 時			
				ロット番号 _____			
				診断キット _____			
				ゲル沈プレート _____			



1) 標準沈降線

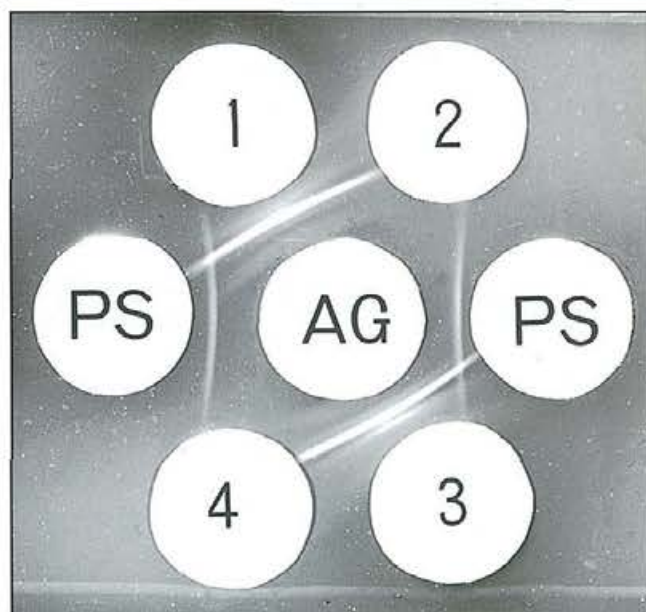
イムノビュア上に、反応させた寒天平板を置き点灯すると、写真のように標準陽性血清と抗原を入れた穴の中間部に鮮明な白線（沈降線）を見ることが出来る。この沈降線は判定の際の基準になるものであるから、明瞭に出現することが絶対に必要であり、もし出現しない場合は、検査をはじめからやり直さなければならない。



2) 陰性

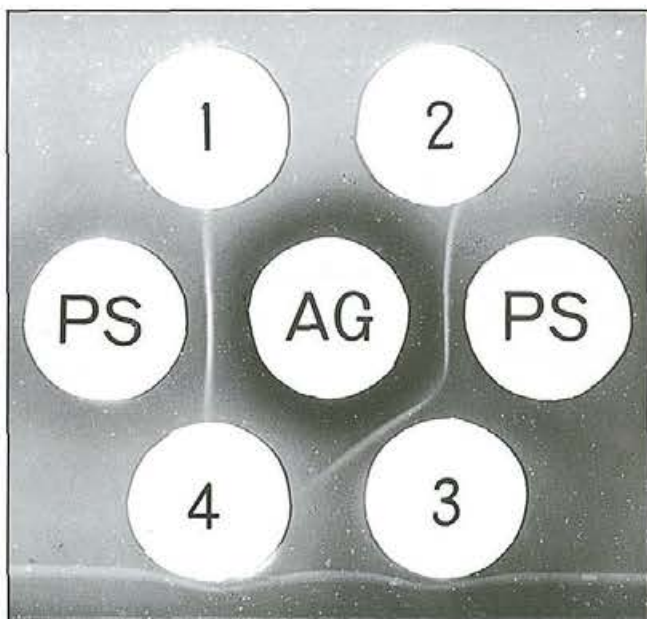
イ、定型的陰性例

写真のように、1、2、3、4、の血清がすべて陰性の場合、標準陽性血清と抗原との間にのみアウターカーブ型の標準沈降線が生じ、血清1、2、3、4の穴と抗原との中間部に、特異的な沈降線は全く生じない。



ロ、非特異例

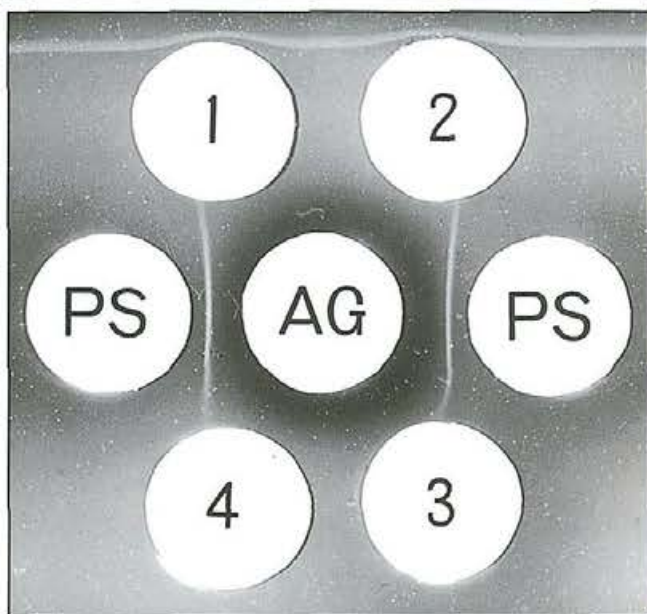
ごく希に、可検血清の中に、抗原内に含まれる伝貧ウイルス以外の成分の抗体がある場合に、可検血清と抗原の間に沈降線を生ずることがある。写真のように血清1および3と抗原の間の沈降線は、伝貧ウイルスに対して非特異的な沈降線で、標準沈降線の末端と交差し融合していない。このような場合、寒天平板をイムノビュア上で若干前後に傾斜して観察すると、標準沈降線と非特異沈降線の関係が判別できる。この例は沈降線が出現しても、伝貧ウイルス抗体によるものでないので伝貧陰性と判定される。



3) 陽 性

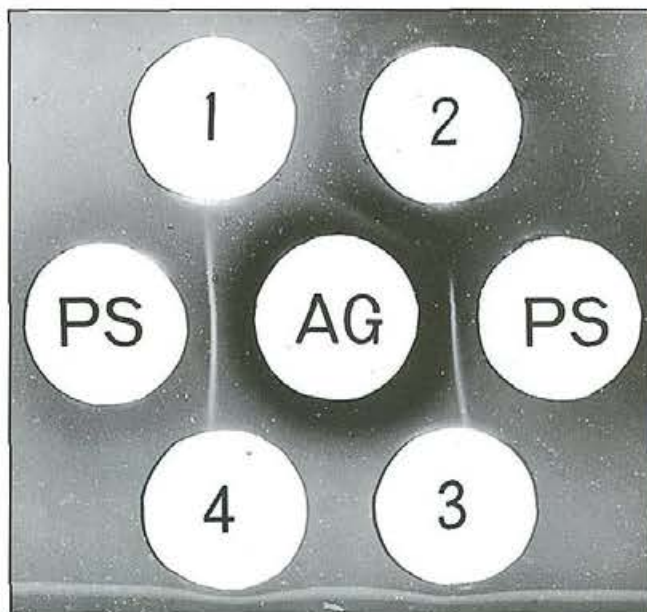
イ、定型的陽性例

写真のように、血清3が陽性的の場合、3と抗原の間には明瞭な沈降線が生じる。この沈降線の末端は、標準沈降線の末端と融合してみられる。この例は伝貧陽性と判定される。



ロ、弱陽性例

写真のように、血清3と抗原の間に明瞭な沈降線は見られないが、標準沈降線の3側の末端が内側にまがって見えることがある。このような沈降線は、可検血清中の沈降抗体価が低い場合に出現する傾向がある。このような例は、施行規則では「疑反応」と判定され、15日から25日の間に再検査を行うことが指示されている。



ハ、強陽性例

写真のように、血清2と抗原の間で、抗原寄りに幅の広い不鮮明な帯状の沈降線が生じ、その末端が標準沈降線の末端と融合してみられる場合がある。これは可検血清中の沈降抗体価が高い場合にみられる現象であり、これも再検査を行い判定の確実性を期す。また、可検血清を生理食塩水で1：2から1：4に希釈して反応を行うと、明確な沈降線として観察される。

4) 非特異反応との共存例

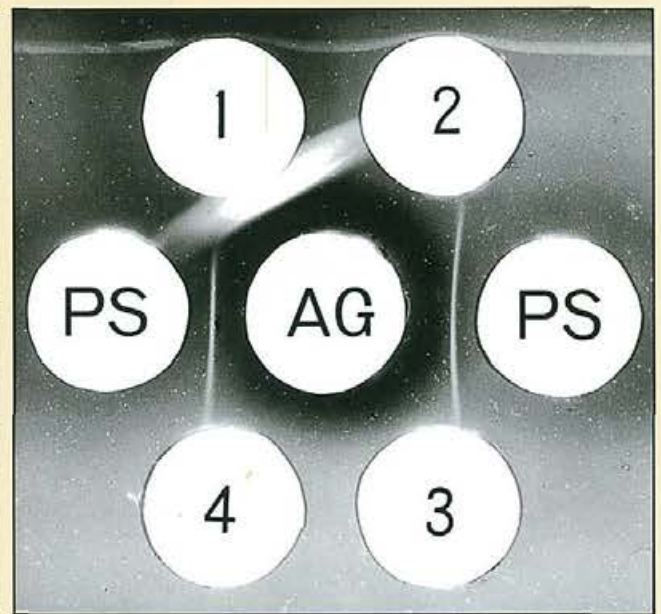
血清中に、伝貧に特異的な沈降抗体と非特異的な沈降抗体が共存している場合、右下の写真のように、両者の沈降線が混在してみられ、明確に判定を下すことが困難なことがある。

この場合には再検査を実施し判定の確実性を期す。現在市販されている抗原は、高度に精製されているため、右下の図のような沈降線の出ることはほとんどない。標準沈降線の曲り具合を正確に追うことが重要である。

非特異反応の原因の大半は、牛血清成分であることから、可検血清に1/10量の牛血清を加え、30分間37℃で保温後に再検査を行うと、非特異沈降線が消滅することが多い。



明確に判定できる例



明確に判定できない例

II エライザの術式

エライザ法とは、Enzyme-linked immunosorbent assayと呼ばれる方法の頭文字を取ったものである。すなわち、伝貧ウイルスのp26と呼ばれる主要内部タンパクと伝貧馬の血清中の抗体との反応を、酵素を使って検出する方法である。抗体検査法としては感度と信頼性の高い方法で、エイズの検査などにも広く使われている。

ここに紹介する方法は、財団法人日本生物科学研究所

と日本中央競馬会競走総合研究所栃木支所とが共同で開発したものである。この方法は、平成14年（2002年）に、家畜伝染病予防法施行規則に取入れられ、本法で陰性であった場合には、伝貧の患畜または疑似患畜でないと判定されることとなった。また、キットとして同年10月に日生研株式会社から「日生研イムノサーチEIA」として市販が開始された。

1 エライザ用キットの構成内容

- 1) エライザプレート：8穴×1列の反応孔からなるモジュールタイプのプレートで、抗原を固着させてある。原則として1検体あたり2穴を使用し、検査頭数に応じて必要数のモジュールをホルダーにはめて使用する。但し、JRAのトレーニングセンターにおける入厩検疫では、1検体あたり1穴を使用している。
- 2) 標準血清：陰性血清（非感染馬から採取した血清）、参照血清（伝貧感染馬の感染初期に採取した血清。この血清の吸光度以上を示した場合には、エライザ陽性と判定する）、陽性血清（感染馬から採取した高い抗体価を示す血清。吸光度1.0前後を示す）の3種類から構成されている。
- 3) プレート洗浄液：0.05%Tween80加生理食塩水（最終濃度）。純水で10倍に希釈する。
- 4) ブロッキング剤：1%ゲラチン水溶液。
- 5) 血清希釈液：1%牛血清アルブミン加リン酸緩衝生理食塩水。
- 6) 酵素標識抗体希釈液（8ml）：0.05%Tween20加リン酸緩衝生理食塩水。
- 7) 酵素標識抗体（30 μ l）：ホースラディッシュ・パーオキシデース標識抗馬IgG(H+L)。20 μ lを6)の酵素標識抗体希釈液に入れ、蓋をして転倒混和して良く攪拌する。
- 8) 発色剤：3,3'-5,5'-tetramethylbenzidine溶液
- 9) 発色停止液：1.0N硫酸

2 試薬類の保存方法

- 1) プレートや試薬類：標準血清（3種類）、酵素標識抗体は-80℃、それ以外は4℃の冷蔵庫に保存する。
- 2) プレートの底を指などで触れたり、吸光度測定の際

邪魔になるような物質を付着させてはならない。また、プレートを直射日光、紫外線、ホルマリン、塩素ガスなどに曝してはならない。



エライザリーダー

マイクロプレートリーダーなどさまざまな呼称があるが、基本的な機能は、96穴マイクロプレートの吸光度を測定する装置である。機種によって機能に大きな差があるが、基本的には2波長測定が可能で、伝賃の検査用のキットを使用する場合には測定波長が450nm、対照波長が600nm前後のものが必要である。また、検査頭数に応じて複数のプレートを連続して測定するスタッカー付きのものが便利である。



プレートインキュベーター

エライザプレートを37℃で保温する装置である。プレート上の位置により反応の進み方が異なることがあるので、プレートを振盪させながら保温できる装置が均一な反応が期待できるので望ましい。



マイクロプレートウォッシャー

反応のステップごとにプレートを洗浄する装置である。一列ずつ洗浄するものから、96穴全部を一度に洗浄するものまで、さまざまなものがあるが、検査材料の数に応じて選択する。洗浄液排出、吸引、オーバーフロー吸引の3本のノズルを備えている装置が望ましい。



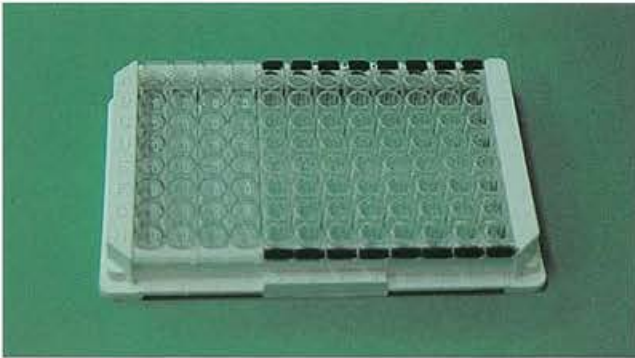
エライザ用キット

抗原を固着してあるプレート、標準血清、酵素標識抗体などの試薬が含まれている。



マイクロピペット

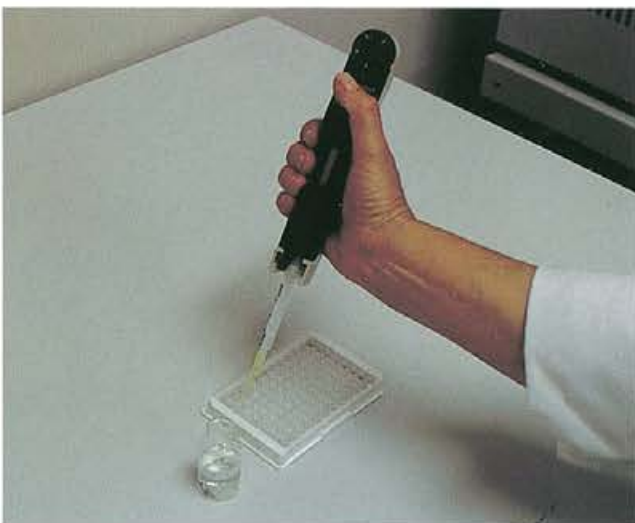
さまざまな規格のものが市販されている。8連のものや連続分注機能のものがあると、反応が迅速に行える。



- 1) 検査材料数に応じたモジュールをホルダーにはめる。陽性血清、陰性血清および参照血清は、毎回コントロールとして同時に検査する。吸光度測定用のブランク穴も必要である。通常は、それぞれに2穴以上検査してその平均値を成績とする。



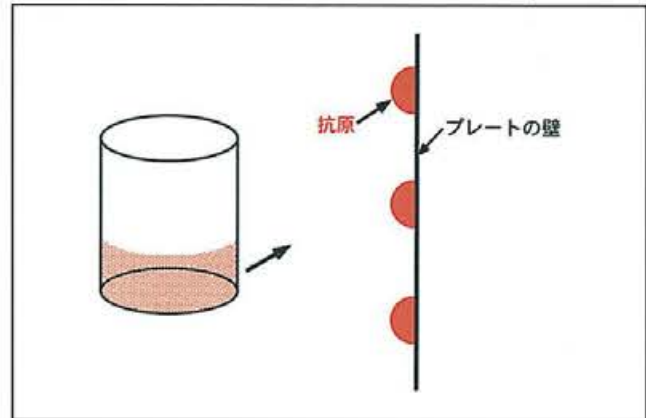
- 2) ブロッキング剤を孵卵器またはウォーターバス (37℃) で30分以上暖める。装置類もウォーミングアップしておく。



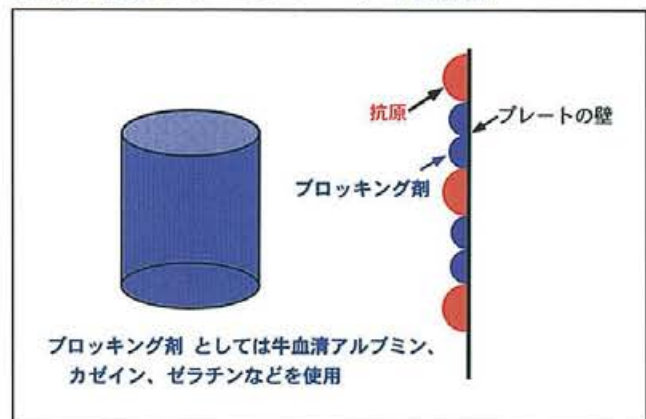
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	吸光度 ブランク		検体5		検体13		検体21		検体29		検体37	
B	標準陽性 血清		検体6		検体14		検体22		検体30		検体38	
C	標準陰性 血清		検体7		検体15		検体23		検体31		検体39	
D	参照血清		検体8		検体16		検体24		検体32		検体40	
E	検体1		検体9		検体17		検体25		検体33		検体41	
F	検体2		検体10		検体18		検体26		検体34		検体42	
G	検体3		検体11		検体19		検体27		検体35		検体43	
H	検体4		検体12		検体20		検体28		検体36		検体44	

エライザプレートには、上記のように標準血清などを配置すると検査が行いやすい。

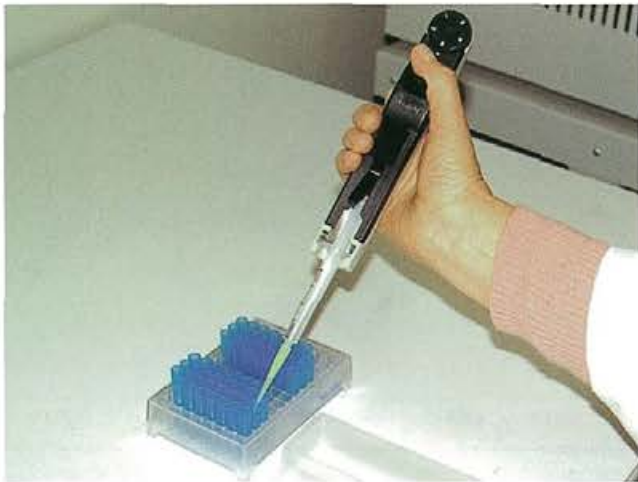
抗原の結合しているプレートの反応孔



抗原の結合しているプレートの反応孔



- 3) プレートには緩衝液などの成分が付着しているので、あらかじめ洗浄液で2回洗浄してから使用する。ブロッキング剤を200 μ lづつ反応孔に入れ、37℃で1時間保温し、3回洗浄する。



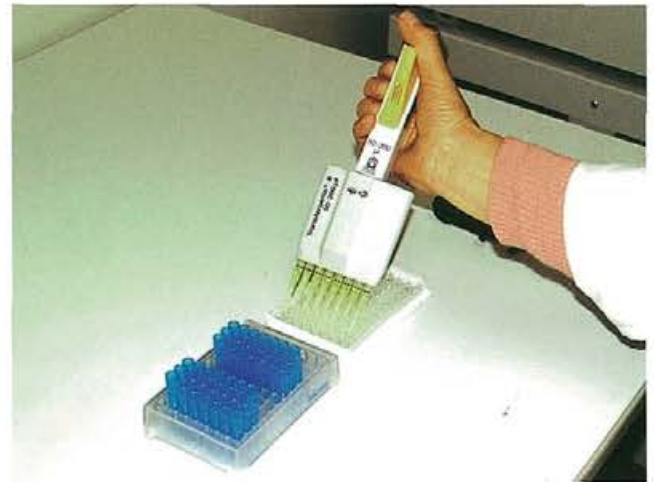
4) 1 ml入りのマイクロチューブを2組用意し、1組目には1 mlの、2組目には350 μ lの血清希釈液を入れる。



5) 1組目のマイクロチューブに陽性血清、陰性血清、参照血清をそれぞれ10 μ lづつ所定の位置に入れる。



6) 1組目のマイクロチューブに10 μ lの可検血清を所定の位置に入れる。

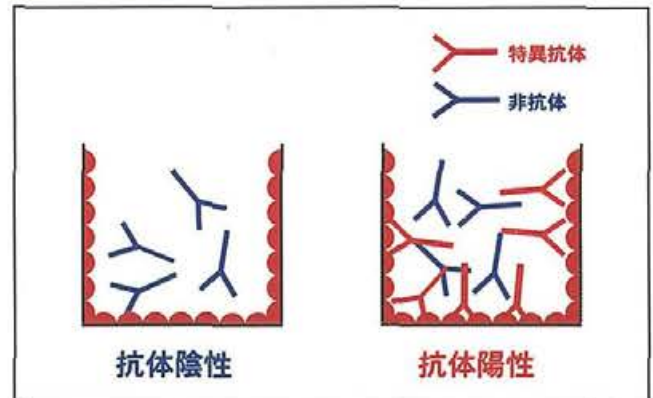


7) 50 μ lに合わせたピペットで1組目のマイクロチューブを攪拌し、50 μ lを2組目のマイクロチューブに移す。さらに攪拌後、同量をエライザプレートに移す。ついで、インキュベーターで40分間反応させ、350 μ l以上の洗浄液で3回以上洗浄する。

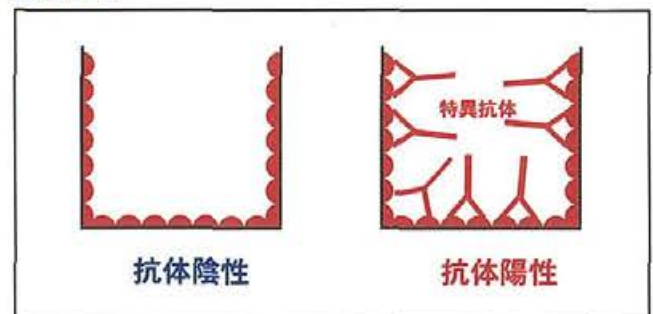
注1：血清希釈について

ここでは希釈の際の正確度を高めるために10 μ lの血清材料から希釈を開始し、2段階で最終的に1：808に希釈する方法を紹介しているが、例えば800 μ lの希釈液に1 μ lの材料を入れ、1段階で希釈する方法を使っても良い。

血清材料を加える



洗浄する





8) 酵素標識抗体を50 μ lずつ、各反応穴に入れ、インキュベーターで20分間反応させ、同様に洗浄する。

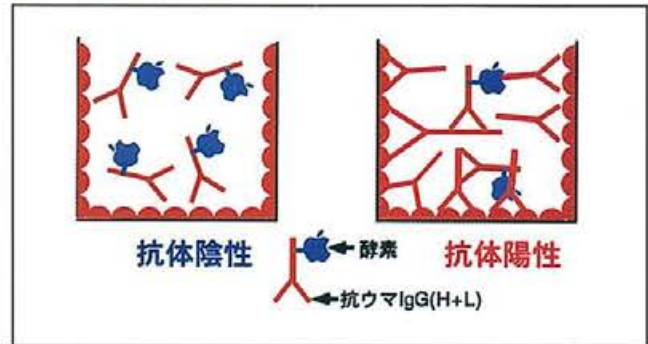


9) 発色液を50 μ l入れ、10分間反応させる。

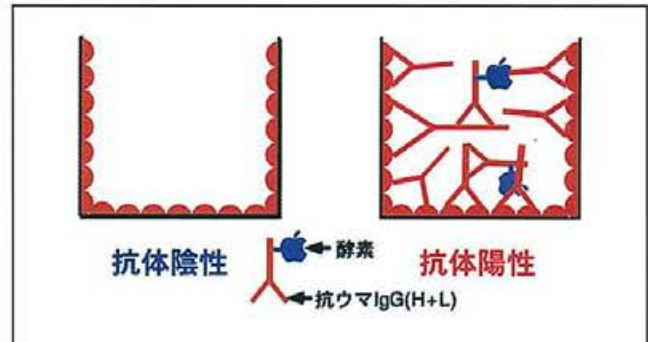


10) 発色停止液を50 μ lづつ入れる。既に入っている発色液にチップの先端が触れないようにする。

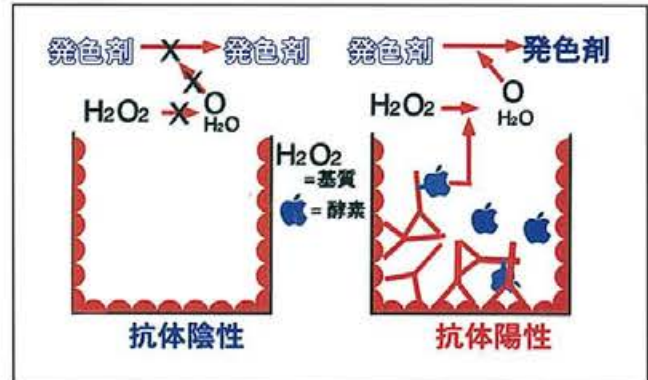
酵素標識抗体を加える



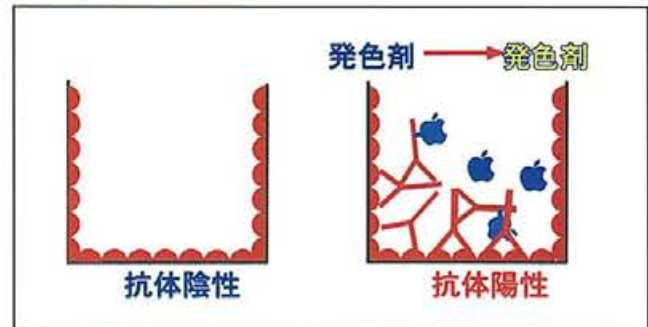
洗浄する



基質と発色剤を加える

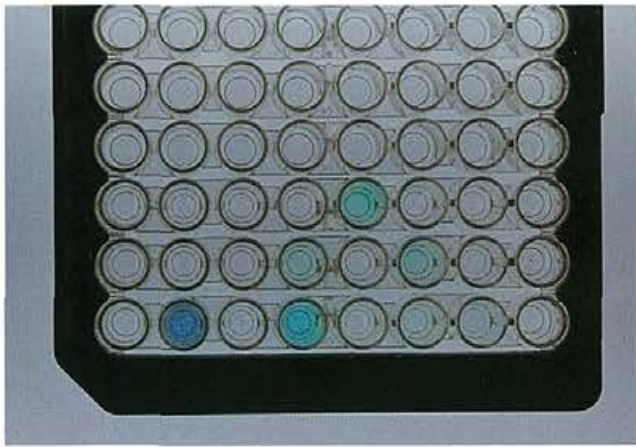


発色停止液を加える

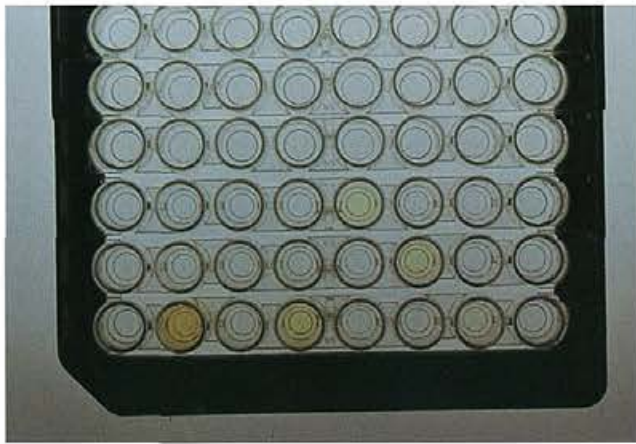


注2：反応時間について

短時間で成績を得るために、可能な限り反応時間を短縮しているが、一般的に行われている血清材料および酵素標識抗体の反応を60分、発色時間を30分に延長する場合には、酵素標識抗体の濃度を低くする必要がある。

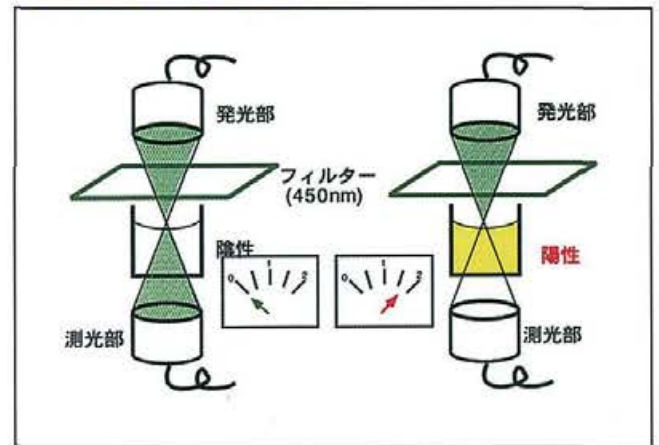


発色液の色が青色から黄色に変わる。



11) 吸光度を測定する。測定波長は450nmとし、傷などの影響を除くための参照波長は600nm前後とする。

吸光度を測定する(415nm)



まず、反応の精度を確認するために陰性血清の吸光度が0.3以下、陽性血清のそれが0.7以上であることを確認する。ついで、試料の吸光度が、参照血清よりも高い場合には、エライザ陽性と判定する。陽性と判定

された場合には、寒天ゲル内沈降反応による確定診断を待つ。プリンターからの出力用紙には、反応の実施者、判定者、キットのロット番号、製造年月日、有効年月日などを記載し、証拠として残す。



JRAトレーニングセンターで使用しているエライザ用のロボット。血清試料および試薬類をセットすると、すべての反応が自動的に行われ、成績がプリントアウトされる。

あとがき

1976年に「馬伝染性貧血の診断のための寒天ゲル内沈降反応の術式」が出版されてから33年が経過しました。その後、1978年に家畜伝染病予防法が改正され、寒天ゲル内沈降反応が馬伝染性貧血の診断法として採用されました。さらに、1984年には第2版が出版され、現在にいたっています。

1978年の法改正直後は、多くの馬が馬伝染性貧血として診断されたものの、1983年以降ほとんど発生は認められておらず、わが国は、ほぼ清浄国と判断して差し支えないと考えられ、関係者の努力に敬意を払うものです。一方、諸外国に目を転じますと、あいかわらず先進国と言えども発生報告は後を断たず、馬伝染性貧血が再度わが国で発生する可能性は皆無とはいえず、徹底した検査の継続の必要性は言うまでもありません。このような状況の中で、日本中央競馬会競走馬総合研究所では、メーカーと共同してスクリーニング法としてのエライザを開発し、実用に供しております。そこで、本冊子に寒天ゲル内沈降反応とエライザについて、その手技をまとめました。これら2種類の方法を組み合わせることにより、馬伝染性貧血の迅速かつ確実な診断が可能となり、わが国における本病の防疫に役立てば幸いです。

日本中央競馬会競走馬総合研究所栃木支所
杉浦 健夫

日本中央競馬会助成事業

地方競馬益金補助事業

昭和51年 第1版第1刷発行
昭和59年7月 第2版第1刷発行
平成13年3月 第3版第1刷発行
平成22年3月 第3版・補訂版第1刷発行

社団法人 中央畜産会

〒101-0021 東京都千代田区外神田2-16-2
第2ディーアイシービル 9階
TEL.03(6206)0832