

糞便中ヨーネ菌遺伝子抽出の自動化に向けた検討

中央家畜保健衛生所

佐藤圭介

吉崎響

大川原志織

篠川有理

濱崎尚樹

小林淳彦

はじめに

ヨーネ病は家畜伝染病予防法において家畜伝染病（法定伝染病）に指定されており、患者は殺処分となることから、農家の経済的損失の大きい疾病である[1-3]。近年、ヨーネ病は全国的に発生が広がり、発生戸数は増加傾向にある[4]。ヨーネ病の感染経路として、重症例では乳汁感染や胎盤感染も起こるが、主要な感染経路は患者の糞便で汚染された餌を介した経口感染とされている。対策として、子牛の分離飼育、環境の衛生対策及び患者の早期発見と淘汰が重要である[1]。ヨーネ病の原因菌である *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*（以下、ヨーネ菌）は抗酸菌の一種であり、遅発育性で、培地上でコロニーの形成に6週間以上を要する[1]。

牛ヨーネ病の検査には、スクリーニング検査として抗体検査（ELISA 検査）及びスクリーニング遺伝子検査（以下、スクリーニング PCR）がある。スクリーニング PCR は、個別の糞便やプール糞便を対象に最大 10 頭分の遺伝子検査をまとめて行うことができる[2, 3, 5]。抗体検査は無症状で排菌している時期の感度が低く、感染牛の発見が遅れる可能性がある[2, 3]。スクリーニング検査で陽性となった場合、確定検査として糞便中の遺伝子量を定量する検査（以下、定量 PCR）が行われ、ヨーネ菌遺伝子量が 0.001pg/2.5 μ l 以上であると患者と判定される[2, 3]。糞便からの遺伝子抽出はヨーネ病検査マニュアル（以下、検査マニュアル）[5]に基づき、専用の抽出キットを用いて実施される。

本県において牛ヨーネ病が発生した場合、新潟県牛のヨーネ病防疫対策要領に基づき、発生農場では同居牛の全頭検査及び移動牛の検査が実施される。乳用牛 50 頭規模の発生例では、令和 5 年 11 月に患者が摘発されてから令和 8 年 2 月現在まで、移動牛の検査が 30 回、のべ 88 頭行われ、同居牛の全頭検査が 5 回実施されている。仮に複数農場で発生した場合や大規模農場での発生時には、検体数や検査頻度がさらに増加することが予想される。今年度、農林水産省が公表したヨーネ病に関する全国調査（令和 7 年 7 月 23 日公表）によると、スクリーニング PCR に関して、抽出作業に多くの労力及び時間を要することや、同居牛

検査を実施する際の検査担当者の負担増加が課題として挙げられており、抽出作業の効率化が求められている[5]。自動核酸抽出機（以下、自動抽出機）は、近年、全国の病性鑑定施設で広く導入されており、令和 7 年度の家畜衛生研修会（細菌部門）のアンケート結果では、回答のあった 43 都道府県中 38 県が自動抽出機を導入しており、そのうち 27 県が magLEAD12gC（プレジジョン・システム・サイエンス株式会社）を所有している。本県も同機種を所有しており、筆者らは昨年、患者の臓器および環境材料からの遺伝子抽出に magLEAD12gC を活用できることを報告した。一方で、ヨーネ菌を既知量含む糞便では、抽出キットと検出結果は一致したものの、定量値は抽出キットの半分程度であった[6]。そこで今回は糞便に焦点を当て、関係機関の協力を得た上で、糞便中ヨーネ菌遺伝子抽出の自動化（以下、自動抽出）を検討した。

材料及び方法

試験 1 検定用糞便を用いた前処理法の検討

ヨーネ菌を含む検定用糞便として、ヨーネ菌 1000、100、10、0 個/ml を含んだ 4 種類の糞便検体を用い、各検体を個別の糞便として供試した。さらに、各検定用糞便を 9 頭分の陰性糞便に加え、10 頭分のプール糞便液を 4 検体作成し、供試した。

<前処理> ① 糞便1gを20mlの滅菌蒸留水で希釈 ② 激しく攪拌、30分静置 プール糞便：「ヨーネ病検査マニュアル」に従いプール糞便液を製 ③ 個別の糞便：上清の中層部から1ml、プール糞便液：全量を 2mlチューブ（ザルスタート(株)）に移し遠心（20,000g 5分 室温）、 上清を除去 ④ ヨーネピュアスピン（ニッポンジーン(株)）に付属するビーズ全量を ③に加える ⑤ ヨーネピュアスピン 抽出液①-A 350 μ l添加し、破碎処理を実施 ⑥ 遠心（20,000g 5分 室温） 遠心中にS.T.A.R Buffer（ロシユ社）100 μ lを分注 ⑦ 遠心後の上清を⑦に加えて10回ピペッティング 個別の糞便：全量、プール糞便液：400 μ lをmagLEAD専用チューブに分注
<自動抽出機> ⑧ 自動抽出機で抽出 抽出試薬：MagDEA Dx SV（プレジジョン・システム・サイエンス(株)） 抽出条件：other matrix、400 μ l → 50 μ l ⑨ 抽出物を回収し遠心（10,000xg 10分 室温） 上清をPCRのテンプレートとする

図 1 自動抽出のプロトコル

自動抽出のプロトコルを図 1 に示す。自動抽出との比較として、ヨーネピュアスピンを用いた抽出キットによる遺伝子抽出を検査マ

マニュアルに従って実施した。自動抽出とヨーネピュアスピンいずれも、マイクロスマッシュ（トミー精工株式会社、Micro Smash MS-100）を用いて、検査マニュアルに記載の条件と同様に 4,600rpm で 3 分間の破碎処理を行った。

定性及び定量判定の結果を比較するため、リアルタイム PCR (rPCR) を実施した。検定用糞便 1 頭分には、ヨーネファインド（ニッポンジーン株式会社）を用いたスクリーニング PCR 及びヨーネファインドプロ（ニッポンジーン株式会社）を用いた定量 PCR を、それぞれ実施した。10 頭分のプール糞便には、ヨーネファインドを用いたスクリーニング PCR を実施した。いずれの PCR 検査も検査マニュアルに従って行った。リアルタイム PCR 装置には、ABI7500（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）を使用した。

試験 2 患畜及び実験感染牛の糞便での検証

材料として、患畜及び実験感染牛の糞便 32 検体と陰性糞便 7 検体、合計 39 検体を個別糞便として供試した。さらに、各 1 頭分の糞便を 9 頭分の陰性糞便に加え、10 頭分のプール糞便液を計 39 検体作成し、供試した。これらの検体に対して、自動抽出及び抽出キットを用いた抽出、さらに rPCR を試験 1 と同様に行った。患畜及び実験感染牛の糞便 32 検体は、遺伝子量の多い検体（最大値：94.50pg/2.5 μ l）から検出限界付近（0.001pg/2.5 μ l 未満、最小値：0.00037pg/2.5 μ l）の幅広い遺伝子量を持つ検体を用意した。検出限界付近の検体には、8 検体を用いた。統計処理には EZR[7] を使用し、1 頭分糞便の定量値の比較について、Wilcoxon 符号付順位和検定を行った。

両抽出法の労力及び作業時間の比較

自動抽出及び抽出キットの労力指標として作業手順数、さらに両抽出法の作業時間を比較した。抽出キットの作業手順数については、検査マニュアルに記載された「糞便からのヨーネ菌 DNA 抽出」のフローチャートに基づき、手順数を参照した。作業時間の検証は、本県の乳用牛 50 頭規模の牛ヨーネ病患畜発生農場で行われた同居牛検査（プール糞便検体を含む）及び移動牛検査において、1 回あたり平均 3.4 検体（検査回数 34 回、のべ 120 検体）の検査が行われていることをもとに、実際の検査例に近い形で 3 検体試験時の作業時間を比較した。さらに、牛ヨーネ病発生後 3 年間の同居牛及び移動牛の検査に要する作業時間及び労力（作業手順数）を、本県乳用牛 50 頭規模の発生農場の実例をもとに算出し、加えて仮に 500

頭規模の農場で牛ヨーネ病が発生した場合も試算した。

結果

試験 1 検定用糞便を用いた前処理法の検討

スクリーニング PCR の結果、検定用糞便 1 頭分及び 10 頭プール糞便のいずれにおいても、両抽出法の結果は全て一致した。定量 PCR においても、ヨーネ菌遺伝子の定量値は、自動抽出と抽出キットで同等の結果を示した（図 2）。

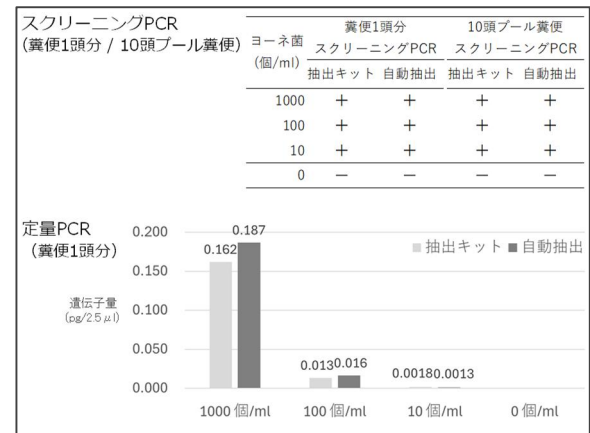


図 2 検定用糞便での試験結果

試験 2 患畜及び実験感染牛の糞便での検証

個別の糞便及び 10 頭プール糞便における両抽出法のスクリーニング PCR の結果を図 3 に示した。個別の糞便では両抽出法の結果が全て一致し、10 頭プール糞便においても、39 検体中 37 検体の結果が一致した（一致率 94.9%）。不一致の 2 検体は、いずれも検出限界付近の検体であった。また、個別の糞便及び 10 頭プール糞便の検出結果を比較したところ、検出限界付近の検体では、同じ抽出法であっても結果が不一致となるものが複数認められた。

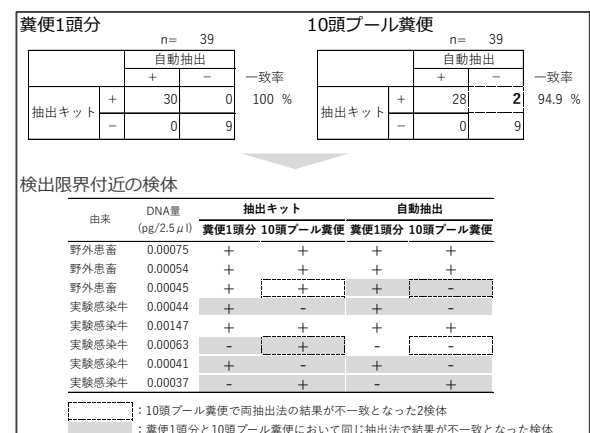


図 3 患畜・実験感染牛の糞便及び陰性糞便でのスクリーニング PCR の結果

患者と実験感染牛の糞便及び陰性糞便における定量 PCR の結果を図 4 に示した。両抽出法のヨーネ菌遺伝子検出結果は、39 検体中 38 検体が一致した（一致率：97.4%）。不一致の 1 検体は、検出限界付近の検体であり、自動抽出のみで遺伝子の検出が陽性であった。定量値の比較では、検出限界付近の検体で多少のばらつきがみられたが、両抽出法間で有意差は認められなかった（P=1）。

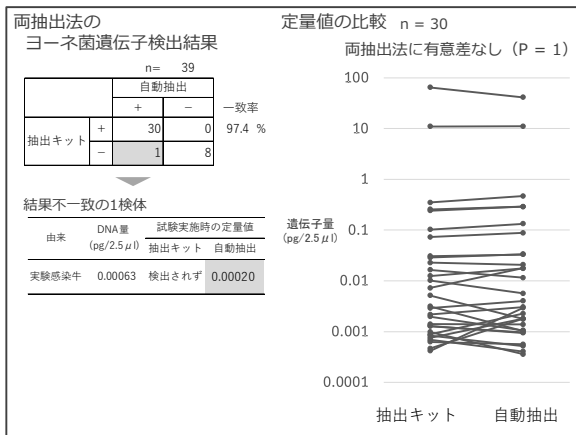


図 4 患者・実験感染牛の糞便及び陰性糞便での定量 PCR の結果

両抽出法の労力（作業手順数）及び作業時間の比較結果を図 5 に示した。自動抽出法では、1 回の検査にかかる労力及び作業時間が、抽出キット法に比べていずれも 1/2 以下であった。本県の乳用牛 50 頭規模の牛ヨーネ病患者発生農場の実例及び、仮に 500 頭規模の農場で牛ヨーネ病が発生した場合においても、自動抽出は抽出キット法に比べて労力が 1/2 以下に、作業時間が 1/3 以下に短縮される結果が得られた。

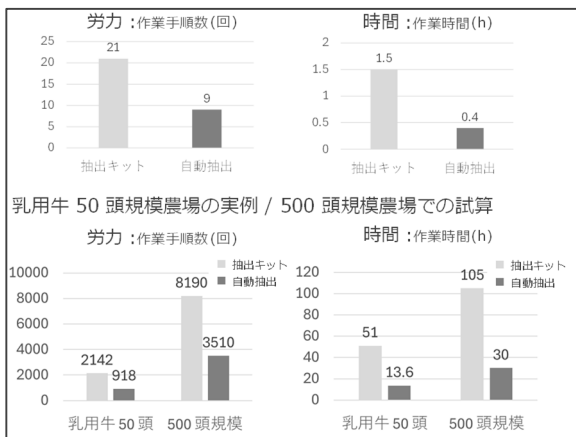


図 5 両抽出法の労力及び作業時間の比較

考察

今回、糞便中のヨーネ菌遺伝子抽出の自動化に向けた検討を行い、遺伝子検査における定性及び定量判定の結果を従来のキットによる抽出法と比較した。その結果、自動抽出は抽出キットと同等に、いずれの rPCR でもヨーネ菌遺伝子を十分に検出できることが確認された。このことから、自動抽出の有用性が示された。

前回検討した患者の臓器及び環境材料では、破碎処理後の遠心上清に着色がほとんど見られなかったが、糞便、特にプール糞便では顕著に着色がみられ、この点が両者の性状の大きな違いであった[6]。糞便は同居牛検査、移動牛の検査及び確定検査で使用されるが、生物材料として多くの PCR 阻害物質を含んでいるため[8,9]、より高い検査精度が求められる上に、遺伝子抽出及び精製の難易度も前回よりも上がっていた。この課題を解決するために、外部精度管理調査で使用された試料と同じ方法で作製された検定用糞便を最初に活用し、自動抽出の前処理法の検討を進めた。

ヨーネ菌は他の細菌と異なり、脂質に富んだ細胞壁を持つ[1,10]。さらに、糞便中の PCR 阻害物質を効果的に除去する必要もあった。これらを考慮し、自動抽出の前処理には破碎ビーズを後から投入する方法、破碎処理及び洗浄処理の 3 段階の工程を取り入れた。破碎ビーズを後から投入することにより、PCR 阻害物質を含む遠心後の上清をより効率的に除去できる。データには示していないが、破碎処理を行わない場合、ヨーネ菌遺伝子が全く検出されないことが確認されており、破碎処理は遺伝子抽出において必須であると考えられる。一方で糞便中の有機物等の成分も破碎されることにより、遠心後の上清に着色が認められ、特に 10 頭プール糞便では顕著であったことから、破碎処理後に糞便中の PCR 阻害物質を除去するバッファーを混和する洗浄処理を組み入れた。自動抽出のプロトコルを作成していた段階で洗浄処理を行わないプロトコルで遺伝子抽出を試みた結果、ヨーネ菌を含む糞便、特に 10 頭分のプール糞便において、スクリーニング PCR でヨーネ菌遺伝子及びインターナルコントロールのいずれも検出されず、判定不能となる検体が確認された。このことから、自動抽出の前処理において洗浄処理が重要な役割を果たすことが示唆された。

自動抽出のプロトコルは、労力及び作業時間を従来の抽出キットよりも半分以下に圧縮することができ、操作も容易であった。特に、大規模農場でヨーネ病が発生した場合には、

自動抽出が従来の抽出キットを用いた方法に比べて大きな利点を持つと考えられる。抽出キットはすべての過程を手作業で行う必要がある、特に多検体の場合には膨大な労力及び時間を要するが、自動抽出では前処理を行った後、抽出作業は自動抽出機に委ねることができるため、作業の負担が大幅に軽減される。

以上から、糞便中ヨーネ菌遺伝子抽出に自動抽出機の導入が可能であり、自動抽出により遺伝子検査の迅速化及び効率化が可能と考えられた。今回使用した magLEAD12gC では 12 検体同時に抽出が可能であり、10 頭分のプール糞便を検体とした場合、一度に最大 120 頭分を同時に抽出することができる。自動抽出は多検体に対応しやすく、検査業務以外の労力と時間をより多く確保できる。また、スクリーニング PCR の導入が容易になり、抗体検査よりも早期に患畜を摘発できるため、清浄化対策の推進につながると考えられる。自動抽出機は、現在全国の家畜保健衛生所での導入が進んでおり、magLEAD12gC を所有する他の病性鑑定施設でも実施することが可能である。さらに、他社製の自動抽出機にも応用できる可能性があり、ヨーネ病対策がより効率的に進められることが期待される。今後も関係機関との情報共有や意見交換を進めながら、ヨーネ菌遺伝子抽出の自動化に向けてさらに検証を重ね、より迅速かつ効率的な遺伝子検査の実装化を目指し、ヨーネ病対策の推進に貢献できるよう努めていきたい。

謝辞

稿を終えるにあたり、検定用糞便、患畜及び実験感染牛の糞便の提供並びに前処理法及び試験計画のご指導、ご助言を賜りました、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部門研究推進部研究推進室推進チーム長兼動物感染症研究領域細菌グループ川治聡子先生に深謝致します。また統計処理のご指導、ご助言を賜りました、動物衛生研究部門研究推進部研究推進室長 小林創太先生に深謝致します。

参考文献

- [1] 動物の感染症，第四版，明石博臣ほか編，124-125，近代出版，東京(2019)
- [2] 川治聡子：臨床獣医第 43 巻第 4 号，18-23 (2025)
- [3] 川治聡子：畜産技術 2024 年 6 月号，12-16 (2024)
- [4] 農林水産省ホームページ 監視伝染病発生年報（平成 10 年分～令和 6 年分）

[5] ヨーネ病検査マニュアル（2024 年 4 月 1 日版），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ホームページ

[6] 佐藤圭介ら：令和 6 年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録，1-4 (2025)

[7] Y Kanda: Bone Marrow Transplantation 48, 452-458 (2013)

[8] 鶏病研究会：鶏病研究会報第 60 巻第 2 号，53-67 (2024)

[9] 蓮沼俊哉ら：日本畜産学会報 86(3), 313-318 (2015)

[10] 動物微生物検査学，初版，福所秋雄ほか編，16-17，近代出版，東京 (2014)