

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

**特開2004-279387**  
(P2004-279387A)

(43) 公開日 **平成16年10月7日(2004.10.7)**

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/569</b>	GO 1 N 33/569	2 G O 4 5
<b>C 1 2 Q 1/24</b>	C 1 2 Q 1/24	4 B O 6 3
<b>GO 1 N 33/48</b>	GO 1 N 33/48	S
<b>GO 1 N 33/53</b>	GO 1 N 33/53	N

審査請求 未請求 請求項の数 7 書面 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願2003-113460 (P2003-113460)	(71) 出願人	503015503 シゲタ動物薬品工業株式会社 富山県小矢部市小森谷4569番地1
(22) 出願日	平成15年3月12日 (2003.3.12)	(72) 発明者	西尾 義行 富山県小矢部市小森谷4569-1 シゲ タ動物薬品工業株式会社内
		Fターム(参考)	2G045 AA13 BB03 CB30 FB03 4B063 QA01 QA18 QQ06 QS10 QS33

(54) 【発明の名称】 家禽類への病原性微生物の感染の有無を検査するため産卵を用いる検出法

(57) 【要約】

【課題】家禽類への病原性微生物の感染検査法として1回に多数検体を測定することを可能にした。このために、検体試料として産卵を用いこの卵黄に含まれる目的抗体を検出した。また、試料採取法としては一定体積のろ紙を用いた。

【解決手段】従来、家禽類への病原性微生物の感染の有無を検査するために、血漿を用いて病原性微生物に対する抗体の有無を調べていた。今回、血漿中同様に家禽類が産む卵黄中にも抗体が存在することを見出した。しかし、卵黄は血漿と異なり粘性が大きいため、卵黄から定量的に試料採取することは、極めて難しかった。そこで、試料採取法として一定体積(横、縦、厚さ)のろ紙を用いる方法を開発した。この方法により、家禽類への病原性微生物の感染の有無について多数の検体を正確かつ迅速に検査することを可能にした。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

家禽類を対象に病原性微生物の感染の有無を検査するため、検体試料として産卵を用いる抗体検出法。

## 【請求項 2】

家禽類を対象に病原性微生物の感染の有無を検査するため、検体試料として産卵を用いる E L I S A 法（酵素免疫測定法）。

## 【請求項 3】

家禽類を対象に Q 熱菌の感染の有無を検査するため、検体試料として産卵を用いる抗体検出法。

10

## 【請求項 4】

家禽類を対象に Q 熱菌の感染の有無を検査するため、検体試料として産卵を用いる E L I S A 法（酵素免疫測定法）。

## 【請求項 5】

抗体など免疫検査をするための試料採取法として、一定体積（縦、横、厚さ）のろ紙を用いる方法。

## 【請求項 6】

卵黄のような粘性の大きい試料から抗体など免疫検査をするため試料採取法として、一定体積（縦、横、厚さ）のろ紙を用いる方法

## 【請求項 7】

卵黄のような粘性の大きい試料から Q 熱菌検査をするため試料採取法として、一定体積（縦、横、厚さ）のろ紙を用いる方法

20

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明が属する技術分野】

本発明は、病原性微生物の検査において対応する抗体を検出することにより 1 回に多数の検体を検査する方法である。

## 【0002】

## 【従来技術】

家禽類の産卵あるいは食肉は無菌ではなく、Q 熱菌あるいはサルモネラ菌など病原性微生物によりしばしば感染している。この感染している生卵あるいは生肉を食べた人は、この病原性微生物に感染し罹患するケースがある。このため、食用として飼育されている家禽類については、全数、病原性微生物への感染の有無を検査する必要がある。ところが、食用の家禽類は、極めて多数が飼育されているため、従来は、家禽類の全数を検査することはできていなかった。

30

## 【0003】

本発明により、病原性微生物に感染している食用家禽類の全数について検査することを可能にした。

## 【0004】

ところで、従来、家禽類の病原性微生物への感染の有無を検査する方法としては、次の方法があった。

40

1. 検査用試料としては、血液、痰あるいは化膿汁などが用いられていた。
2. 測定方法としては、
  - 1) 血液を用いて、E L I S A 法（酵素免疫測定法）あるいは蛍光抗体法（I F A）、などにより、病原性微生物に対する抗体を検出し確認する方法。
  - 2) 血液および痰などの試料を用いて、P C R（P o l y m e r a s e c h a i n r e a c t i o n）法により病原性微生物に特異的な D N A 配列を検出し確認する方法。
  - 3) 血液および痰など体液を培養することにより、感染した微生物を増殖した後、分離同定する方法。
  - 4) 血液および痰など体液を電子顕微鏡で観察し形態的に同定する方法。

50

3. 検体試料の採取方法として、従来、マイクロピペットを用いていた。

【0005】

上記の方法のうち、比較的多数の検体を処理できる方法はELISA法である。家禽類の検体を測定する際、検体試料としては血液が汎用されている。このため、検査をするためには家禽類より採血することが必要である。

【0006】

ところが、家禽類の採血部位は手羽の内側など難しい部位にあり、しかも細いため、採血は非常に難しく、時間がかかる。さらに、ELISA法の検体試料を作製するには、採血した血液を遠心で分離し血漿を分取する工程が加わる。

【0007】

このため、1回の検査が100検体程度までの少数検体には対応ができるが、これ以上の検体を処理するには、膨大な人手を要し非常に困難な作業であった。それに加え、食用を目的に家禽類を飼育している業者においては、1飼育場に数万羽以上を飼育している。このような多数の家禽類の全数について病原性微生物の感染の有無を検査することは実質的に不可能であった。

10

【0008】

ところで、試料からの採取方法として、試料が溶液で粘性が小さいものであれば一定量を吸いとる方法であるマイクロピペットなどが用いられている。しかし、卵黄のような粘性の大きい試料についてはマイクロピペットなどで採取する方法は利用できない。このため、試料は微量天秤により重量をはかり、この検体を適当な溶液で希釈し粘性を小さくしてからマイクロピペットなどで採取する方法がとられていた。天秤を用いて試料採取する方法は、時間と人手がかかるため、多数の検体を検査することは極めて困難であった。

20

【0009】

【発明が解決しようとする課題】

食用家禽類への病原性微生物の感染の有無を検査するに当たって全数検査のような多数の検体を測定する際の問題点は、検査する対象である検体試料にあった。

【0010】

【課題を解決するための手段】

病原性微生物への感染の有無を検査する方法のうち、比較的多数の検体を処理できる方法はELISA法（酵素免疫測定法）である。前処理なしで測定する試料であれば、1回、1000検体以上を測定することは可能である。

30

【0011】

ところが、前述のように検体試料として血液を用いると、前処理工程が煩雑で時間と人手がかかる。

【0012】

そこで、ELISA法で検出する病原性微生物に対する抗体が、血液と同様に存在し、しかも前処理が簡単な方法を探し出すため研究を重ねた。その結果、卵の卵黄部分に血漿と同じ抗体が存在することを見出した。

【0013】

しかし、従来、卵黄のような粘性の大きい検体試料を定量的に採取するには、微量天秤で秤量してから適当な溶液で希釈した後、マイクロピペットで採取する方法がとられていた。この採取方法は膨大な時間と人手を必要とした。

40

【0014】

そのため、次に、試料検体の採取法について研究を重ねたところ、一定体積（縦、横、厚さ）のろ紙を用いることにより、ELISA用試料の作製にかかる時間を大幅に短縮することができた。

【0015】

この一定体積のろ紙は、ELISA法だけでなく、抗体あるいは抗原など免疫検査における粘性の大きな試料の採取法として幅広く利用することができる。

【0016】

50

## 【発明の実施の形態】

家禽類への病原性微生物の感染の有無を検査する検体試料として産卵を用いた。産卵を用いることにより食用に飼育されている家禽類の全数検査のような多数の検体試料を測定することを可能にした。

## 【0017】

## 【本検出法の原理】

本検出法の原理は、まず、検査目的とする病原性微生物あるいはこの培養液を抗原として用いる。次に、この抗原に抗体を含む卵黄を加え反応させる。さらに、この抗原・抗体反応体に標識抗体を加え結合させた後、発色剤を加え発色させる。この発色の大きさは、卵黄中に含まれる抗体量に依るので、吸光度を測定し、これを抗体強度とする。

10

## 【0018】

## 【Q熱菌に対する抗体が血漿と同様卵黄中に存在することの確認】

Q熱菌・*Coxiella burnetii* (コクシエイラ・バーネティ) に対する抗体が、鶏の卵黄中に存在するか否かを検討した。

## 【0019】(A) 試験方法

## 1) 抗原液の調製法

Q熱菌・*Coxiella burnetii* (コクシエイラ・バーネティ) アメリカ株、Nine Mile 菌を細胞培養し、この培養液を重炭酸緩衝液で希釈した液を抗原液として用いた。

## 2) 抗体液の調製法

血漿に対する検査でQ熱菌への抗体の存在が確認されている鶏について、この鶏が産んだ卵の卵黄部分を検体とした。この卵黄を先が尖ったピンセットで穴をあけ、この部分に一定体積(縦、横、厚さ)のろ紙を浸し卵黄を吸いとらせた。このろ紙の表面に付着している余分な卵黄は別のろ紙で除いた。この卵黄を含んだろ紙をポリソルベート加リン酸緩衝液に浸し、一夜抽出した。この抽出した液を転倒混和した後、同じ緩衝液で10倍、50倍、80倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、800倍、1000倍および2000倍に希釈し、抗体液とした。

20

## 3) ELISA法による反応

抗原液をマイクロプレートの各穴に分注し、4℃で一夜放置した。この放置したマイクロプレートの各穴に抗体液100 $\mu$ lを加え37℃で1時間インキュベートし、その後、反応液を捨てた。次に、この各穴にパーオキサイド標識抗体100 $\mu$ lを入れ37℃で1時間放置した後、この標識反応液を捨てた。残った各穴に発色剤・ $o$ -フェニレンジアミン塩素酸・過酸化水素水混合液100 $\mu$ lを加え37℃で30分間反応させた。30分経過後、2M硫酸50 $\mu$ lを加え発色反応を停止した。直ちに、各穴について492nmにおける吸光度を測定した。

30

## 4) 抗体強度

各穴について492nmでの吸光度を測定し抗体強度とした。

## 【0020】(B) 試験結果および考察

血漿検査でQ熱に対する抗体の存在が確認されている鶏について、この鶏が産んだ卵黄の抗体強度を調べ、この結果を図1に示した。卵黄の濃度が高くなる、すなわち、希釈倍率が小さくなるにつれ、吸光度は大きくなる「正」の用量反応曲線を示した。したがって、血漿中と同様に卵黄にもQ熱菌に対する抗体が存在することが分かった。

40

## 【0021】

## 【卵黄と血漿の抗体強度の関係】

Q熱菌・*Coxiella burnetii* (コクシエイラ・バーネティ) に対する抗体について、鶏の血漿中に存在するものと卵黄中に存在するものが同じものか否かを検討した。

## 【0022】(A) 試験方法

検体試料としては、Q熱菌に対する抗体の存在が確認されている鶏血漿とこの鶏が産んだ卵を用いた。上記の「Q熱菌に対する抗体が血漿と同様卵黄中に存在することの確認」の

50

項、(A)試験方法に準じて操作した。すなわち、卵黄および血漿のいずれも10倍、50倍、80倍、100倍、200倍、300倍、400倍、500倍、800倍、1000倍および2000倍に希釈しELISA測定用の試料を調製し、以下、同様に操作して試験を行った。

#### 【0023】(B)試験結果

##### 1) 卵黄および血漿の抗体強度に関する用量反応曲線

前項の「Q熱菌に対する抗体が血漿と同様卵黄中に存在することの確認」、(B)試験結果に示したとおり、卵黄中の抗体濃度が高くなる、すなわち、希釈倍率が小さくなるにつれ吸光度も大きくなった。また、図1に示したとおり、血漿の抗体濃度も高くなるにつれ吸光度も大きくなった。しかも、卵黄と血漿の用量反応曲線は平行的であった。

10

##### 2) 同一鶏における卵黄と血漿の抗体強度の関係

前もって、血漿の抗体が陽性であることが確認されている13羽の鶏について、この血漿と卵黄の抗体強度を比較した。図2に示したとおり、いずれの鶏においても卵黄と血漿の抗体強度は近似値であった。すなわち、13羽の鶏に関し、血漿の抗体強度が大きい鶏が産んだ卵黄は、平行的に抗体強度は大きく、また、血漿の抗体強度が小さい鶏が産んだ卵黄の抗体強度は小さかった。

#### 【0024】(C)考察

卵黄および血漿の抗体強度に関する用量反応曲線は、いずれも抗体濃度が高くなる、すなわち、希釈倍率が小さくなるにつれ、抗体強度も大きくなる「正」の関係であった。また、13羽の鶏について試験したところ血漿の抗体強度と卵黄の抗体強度は近似値で平行的であった。したがって、卵黄から検出した抗体と血漿から検出された抗体は、Q熱菌に対する同じ抗体であることを検証した。

20

#### 【0025】

##### 【本試験法の再現性】

本試験の再現性を検討するため、陽性コントロールと陰性コントロールで調べた。陽性コントロールとしては、前もってQ熱菌に対する抗体が陽性であることが確認されている卵黄と血漿、また、陰性コントロールとしては、Q熱菌に対する抗体が陰性であることが確認されている卵黄と血漿を用いた。マイクロプレート4500枚について、各陽性コントロールおよび陰性コントロールを各マイクロプレートの2穴ずつに入れて試験を行った。表1に示したとおり、陽性コントロールはいずれも基準値以上の吸光度を示し「陽性」を示した。また、陰性コントロールはいずれにも発色せず「陰性」を示した。よって、本試験法の再現性は保証できた。

30

#### 【0026】

##### 【実施例1】鶏7000羽に対して卵黄を用いてのQ熱菌感染検査

#### 【0027】(A)試験方法

##### 1) 卵の収集法と卵黄からの試料の採取法

各ゲージに飼育されている鶏は識別できるように色付きマジックペンで色分けした。この色分けされた鶏が産んだ卵は直ちに回収し、ゲージNo.と色を記載し、卵No.と鶏No.の関係を明確にした。回収された卵は、各々、卵黄分離器を用いて卵黄のみを分けとった。この個々に分離された卵黄について、先の尖ったピンセットで軽く穴をあけ、一定

40

##### 2) ELISA用試料液の調製法および試験方法

「Q熱菌に対する抗体が血漿と同様卵黄中に存在することの確認」の項、(A)試験方法に準じて行った。ただし、ELISAの測定には、試料液として100倍希釈液を用いた。

##### 3) 試験の繰り返し回数

同じ卵黄を用いてる紙による試料採取から試験を3回繰り返し行った。

50

**【0028】(B) 試験結果および考察**

鶏7000羽について、これらの鶏が産んだ卵黄中のQ熱菌に対する抗体検査を行った。表2に示したとおり、7000個の卵に対し、陽性のものは6.2%の434個であった。3回の繰り返し試験のいずれも同じ結果となった。したがって、今回の検査では、6.2%の鶏がQ熱菌陽性であった。

**【0029】****【実施例2】アヒル200羽に対して卵黄を用いてのQ熱菌感染検査****【0030】(A) 試験方法**

上記、実施例1、「鶏7000羽の卵黄を用いてのQ熱菌感染検査」、(A)試験方法に準じて行った。

**【0031】(B) 試験結果および考察**

アヒル200羽についてそれぞれが産んだ卵200個に関し、Q熱菌に対する抗体の有無を調べた。その結果、「陽性」は3.5%の7個であった。検体数は少なかったが、鶏に比べ陽性率は低かった。

**【0032】****【発明の効果】**

本発明により、産卵用あるいは食肉用養鶏業者などが飼育している鶏あるいはアヒルなど家禽類への病原性微生物の感染の有無について「全数検査」を可能にした。

**【図面の簡単な説明】**

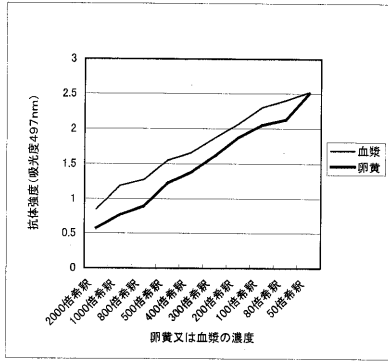
**【図1】** Q熱に感染した卵黄あるいは血漿の濃度と抗体強度の関係を説明したグラフである。(「Q熱菌に対する抗体が血漿と同様卵黄中に存在することの確認」の項)

**【図2】** 同一鶏における卵黄と血漿の抗体強度の関係を説明したグラフである。(「卵黄と血漿の抗体強度の関係」の項)

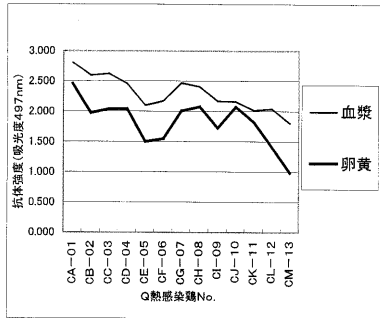
**【表1】** マイクロプレート4500枚を用いて試験の再現性を確認した表である。(「本試験法の再現性」の項)

**【表2】** 鶏7000羽に対して卵黄を用いてQ熱菌の感染検査を行った結果。(実施例1)

【 図 1 】



【 図 2 】



【表1】

試料		検査プレート枚数 (穴数)	陽性プレート枚数 (穴数)	陰性プレート枚数 (穴数)
卵黄	陽性	4500枚	4500枚	0枚
	コントロール	(9000穴)	(9000穴)	(0穴)
卵黄	陰性	4500枚	0枚	4500枚
	コントロール	(9000穴)	(0穴)	(9000穴)
血漿	陽性	4500枚	4500枚	0枚
	コントロール	(9000穴)	(9000穴)	(0穴)
血漿	陰性	4500枚	0枚	4500枚
	コントロール	(9000穴)	(0穴)	(9000穴)

【表2】

繰返 試験	検査卵数	陽性卵数	陰性卵数	判定不能	陽性 コントロール	陰性 コントロール
1回目	7000個	434個 (6.2%)	6566個	0個	すべて陽性	すべて陰性
2回目	7000個	434個 (6.2%)	6566個	0個	すべて陽性	すべて陰性
3回目	7000個	434個 (6.2%)	6566個	0個	すべて陽性	すべて陰性

专利名称(译)	使用产卵检测方法检查病原微生物是否存在家禽感染		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004279387A</a>	公开(公告)日	2004-10-07
申请号	JP2003113460	申请日	2003-03-12
[标]申请(专利权)人(译)	重田动物药业		
申请(专利权)人(译)	重田动物药业有限公司		
[标]发明人	西尾義行		
发明人	西尾 義行		
IPC分类号	G01N33/569 C12Q1/24 G01N33/48 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/569.F C12Q1/24 G01N33/48.S G01N33/53.N		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/BB03 2G045/CB30 2G045/FB03 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ06 4B063/QS10 4B063/QS33		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明的一个目的是使得可以一次测量大量样本作为检测病原微生物对家禽的感染的方法。为此目的，使用产卵作为样品样品检测该蛋黄中含有的目标抗体。此外，作为采样方法，使用固定体积的滤纸。[解决方案]通常，为了检查家禽中是否存在病原微生物，已经使用血浆来检查是否存在针对病原微生物的抗体。在这里，已经发现抗体也存在于由家禽产生的蛋黄中，如在血浆中。然而，与血浆不同，蛋黄具有高粘度，因此从蛋黄中定量取样非常困难。因此，我们开发了一种使用具有固定体积（水平，垂直，厚度）的滤纸作为采样方法的方法。该方法使得可以准确且快速地检查大量样本中是否存在家禽中的病原微生物。[所选图]无

試 料		検査プレート枚数 (穴数)	陽性プレート枚数 (穴数)	陰性プレート枚数 (穴数)
卵黄	陽性	4500枚	4500枚	0枚
	コントロール	(9000穴)	(9000穴)	(0穴)
	陰性	4500枚	0枚	4500枚
	コントロール	(9000穴)	(0穴)	(9000穴)
血浆	陽性	4500枚	4500枚	0枚
	コントロール	(9000穴)	(9000穴)	(0穴)
	陰性	4500枚	0枚	4500枚
	コントロール	(9000穴)	(0穴)	(9000穴)