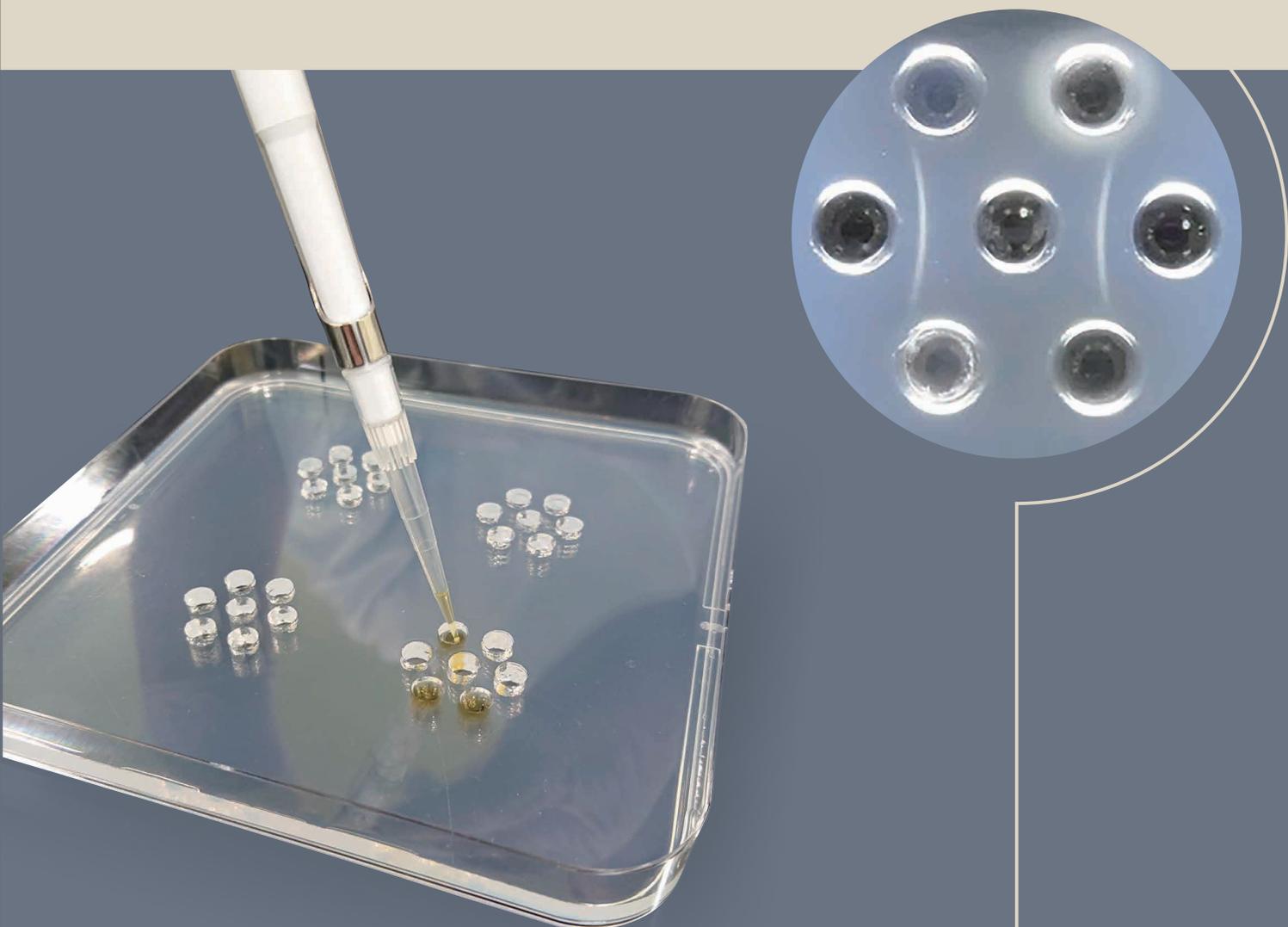


馬伝染性貧血の診断術式

第四版



公益社団法人 中央畜産会

目次

発刊にあたって	1
馬伝染性貧血の国内清浄化と検査体制の変遷	2
国内製 AGID 試薬の供給停止と海外製試薬の使用承認	3
寒天ゲル内沈降反応 (AGID) の術式	4
概 要	4
寒天平板の作成	5
試 薬	7
植え込み	8
判定と記録	9
判定基準	10
おわりに	12
参考文献	13

発刊にあたって

本冊子は馬伝染性貧血の診断技術（寒天ゲル内沈降反応、AGID）を普及する目的で1976年に初版が発行されました。その後、ELISA法が2002年に家畜伝染病予防法施行規則に取り入れられたことを受け、AGIDとELISAの二つの検査法を併記する形に改訂されました。ELISA法はJRA施設において入厩馬のスクリーニング検査に用いられていましたが、本病が国内清浄化する中でその役割を終え、ELISA試薬の国内製品は販売終了しました。こうして国内で馬伝染性貧血診断に用いられる主要な検査法がAGIDのみに戻ったわけですが、その試薬の供給体制も近年大きく変わり、2023年にはついに唯一の国内製品が販売終了となりました。また、国内清浄化を受けて家畜伝染病予防法施行規則からAGIDの術式に関する記載が削除されました。そんな中でも本病診断におけるAGIDの重要性は揺らぐことなく、輸入検疫、病性鑑定、サーベイランスにおいて引き続き欠くことのできない検査法です。本改訂版では、旧家畜伝染病予防法施行規則と最新のWOAH陸棲生物マニュアルにそれぞれ記載された方法から良い点を組み合わせ、現在JRA競走馬総合研究所で実施しているAGIDの術式を解説します。

令和7年8月

公益社団法人 中央畜産会

馬伝染性貧血の国内清浄化と 検査体制の変遷

わが国では、かつて馬伝染性貧血（EIA）が蔓延しており、1950年代には年間数千頭が摘発・淘汰されていたが、寒天ゲル内沈降反応（agar gel immunodiffusion, AGID）の開発により診断精度が向上したことと、家畜伝染病予防法第31条による毎年1回の定期検査・摘発・淘汰によって、感染馬の数は、年々減少した。1980年代以降ほとんど摘発がなく清浄化に近い状態にあったことから、1998年からは、法5条および施行規則9条に基づき、少なくとも5年に1回検査を受ける体制となった。その後、2011年に宮崎県の御崎馬で感染馬が摘発されたことを受け、「在来馬等馬伝染性貧血清浄化推進事業」（2014～2016年）において未検査の在来馬等の検査を行うとともに、全国都道府県の馬飼養衛生状況・EIA検査状況が調査された。そして2017年の馬防疫検討会「馬伝染性疾病清浄度評価専門会議（馬伝染性貧血）」において、国内全体の清浄度を評価し、EIAは清浄化されたとの結論が報告された。清浄化を受け、2018年に法5条検査が廃止されたが、同年の軽種馬防疫協議会議長通知「馬伝染性貧血の自衛防疫指針」において、輸入馬については着地検査中の検査を行うこと、貧血など本病の感染が疑われる馬については検査を行うこと、未検査の競走用馬は競馬場等への入厩前に検査を行うことの三点が示された（ただし未検査の競走用馬に係る部分は2019年の通知から削除）。2020年からは、軽種馬防疫協議会により国内清浄性の確認を目的としたサーベイランスが開始され、結果をInternational Collating Centre（英国ケンブリッジ大学）が発行する四半期レポートで報告している。

国内製 AGID 試薬の供給停止と 海外製試薬の使用承認

上述した清浄化の歴史の中で、国内における EIA の検査需要は低下し、現在では、輸入検査と着地検査、清浄性確認のためのサーベイランス、病性鑑定等に限られることから、国内の検査総数は年間数千件程度と推測される。AGID 試薬については、国内では長らく日生研株式会社製の国家検定品が使われていたが、検査需要の低下により供給体制が不安定になった。これを受け、2019 年に設置された馬防疫検討会「馬伝染性貧血診断のためのゲル内沈降反応に関する専門会議」において、海外 3 社（IDEXX（米国）、VMRD（米国）、Zoetis（米国））の AGID 試薬について診断精度を評価し、日本での使用が承認された。当時の会議では、① JRA 競走馬総合研究所が行った IDEXX と日生研の比較（Nemoto *et al.*, J Vet med Sci, 2018）、② 農林水産省動物検疫所が行った VMRD と日生研の比較、③ カナダ食品検査庁が行った IDEXX、VMRD、Zoetis の比較（Pare *et al.*, Can J Vet Res, 2004）の結果を総合的に評価し、海外製 AGID 試薬（上記 3 社）の診断精度が日本製（日生研）のものと同程度であると結論付けられた。その後、上記 3 社のうち IDEXX と Zoetis の試薬供給が停止したことから、2022 年に再び馬防疫検討会専門会議を立ち上げ、新たに IDVet（フランス）製および NECVB（中国）製試薬について診断精度を評価し、使用を承認した。本来であれば、法定伝染病の診断には国家検定を受けた動物用診断薬を使うことが望ましいが、こうした海外メーカーにとって日本の馬産業市場はあまりにも小さく、薬事承認を得るためにかかる膨大な労力と資金を考えれば、今後も正式な参入は見込まれない。大学等の学識経験者、農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課、動物衛生課、動物検疫所、動物医薬品検査所、農研機構動物衛生研究部門、JRA 競走馬総合研究所が参画する馬防疫検討会による使用承認は、正式な薬事承認とは異なるが当面の検査需要に応えるための現実的な解決法と言える。

寒天ゲル内沈降反応 (AGID) の術式

概要

AGID では、寒天の平板に 3 mm 間隔で 2 つの穴（直径 5 mm）をあけ、それぞれにウイルス由来の抗原と被検血清を入れる。24 ～ 48 時間経過すると、両者はゲルの中を拡散して会合し、抗原抗体反応により沈降線が形成される。この沈降線は、背景を暗くして斜めから光を当てると白色の線として肉眼で観察できる。

AGID は、1970 年代の同時期に、中島らと Coggins らによってそれぞれ独立して開発された。50 年以上が経った現在でも、最も信頼性が高く汎用性のある方法とされている。一方、欧米など馬の飼養頭数が多い国や本病の流行国で、多検体の検査を行う場合には、ELISA 法がよく用いられる。これは検査にかかる時間が短く多検体処理に向くためであるが、同法は非特異反応による偽陽性を生じやすく、陽性検体については、AGID やイムノプロット法による確認検査が必要となる。上述の通り我が国では検査数が少ないため、通常の検疫やサーベイランス等は AGID で対応できるものと考えられる。AGID の手技については、日本の旧家畜伝染病予防法施行規則に記載された方法（現在では削除されている）と WOAHP 陸棲生物マニュアル記載の方法では、ゲルの組成、穴の大きさと間隔、試薬・血清の配置においていくつか相違がある。しかし、検査法の原理に鑑みて、これらの違いは検査結果に大きな影響を及ぼすものではないと考えられることから、実際の検査においてはそれぞれの方法のメリット・デメリットを勘案しながら、必要に応じ組合せて行うのが現実的である。以下に、JRA 競走馬総合研究所で実施している AGID の術式を示す。

寒天平板の作成

材料

- アガロース
- 0.145M ホウ酸バッファー (pH 8.6 ± 0.2)
ホウ酸 9 g と水酸化ナトリウム 2 g を滅菌蒸留水 1,000 mL で溶解する。必要に応じて 1N-塩酸または 1N-水酸化ナトリウムで pH が 8.6 ± 0.2 となるよう調整する。

作成手順

- 0.145M ホウ酸バッファー (pH 8.6 ± 0.2) にアガロースを 1%(w/v)になるよう加える。容器重量を測定した後、加温溶解して粒が見えなくなるまで溶かす (図 1)。¹⁾
- 加温後の容器重量を測定し、蒸発した水分と等量の滅菌蒸留水を加え、50℃前後まで冷却する (目安: 容器ごと 2~3 分水浴して容器表面に手で触れられる程度)。
- ゲルの厚さが約 3 mm となるように、溶解したゲル溶液をペトリディッシュに入れる (120 mm 四方のペトリディッシュの場合、60 mL) (図 2)
- 水平な検査台上で蓋をずらして 1 時間程度静置し、ゲルを凝固させる (穴あけ前のゲルは冷蔵で 1 週間程度保存可能)。

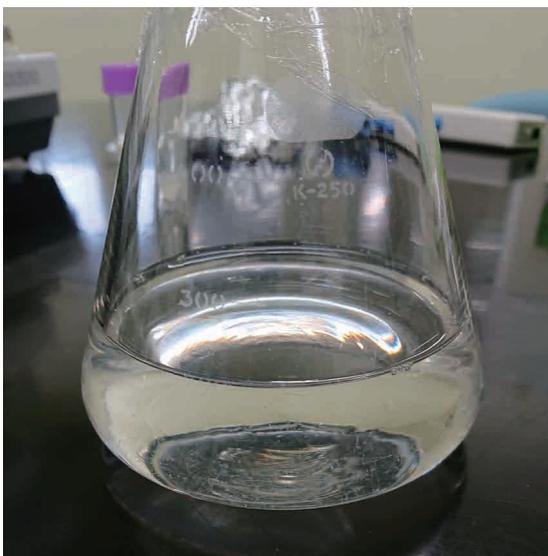


図 1 加温後のゲル

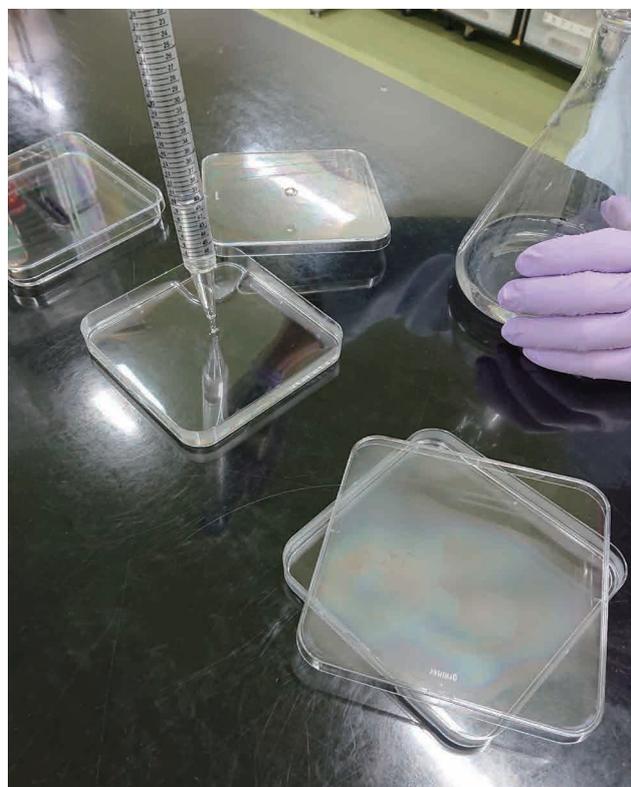


図 2 ゲル溶液をシャーレに入れる

-
- ゲルパンチャーで中央に直径5 mmの穴を1個、その周りに3 mmの等間隔で直径5 mmの穴を6個あける（図3）。^{2) 3)}

1) ゲルの組成については、WOAH マニュアル記載の上記組成のほうが、旧家畜伝染病予防法施行規則記載の0.8%(w/v)アガロース生理食塩水よりゲルの透明度が高く、沈降線を観察しやすいためこちらを採用している。

2) WOAH マニュアル記載の方法では穴の直径は5.3 mm、間隔は2.4 mmとなっているが、日本では長らく旧家畜伝染病予防法施行規則記載の方法に則って検査が行われてきたため、JRA 競走馬総合研究所では現在も上記の通り直径5 mm、間隔3 mmで穴あけを行っている。

3) 120 mm 四方ペトリディッシュを用いる場合、1枚のディッシュに（中央1穴+周囲6穴）×9セット、血清36検体を検査可能である（図4）。

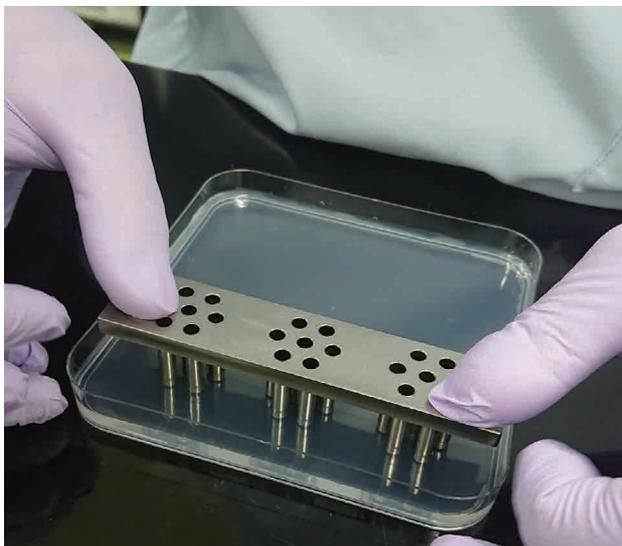


図3 ゲルパンチャー

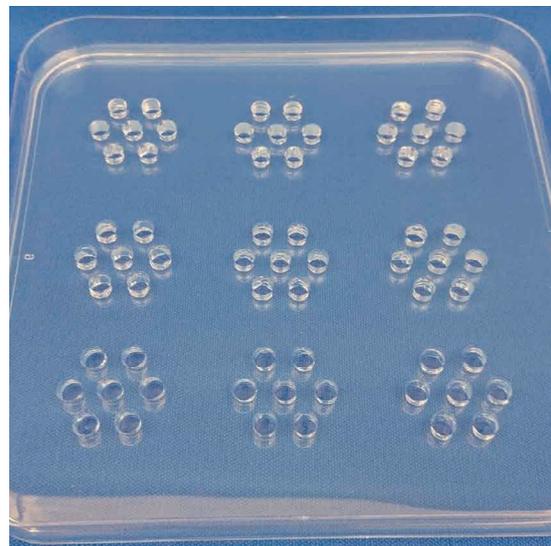


図4 穴あけ後のゲル（36検体用）

試薬

2025年現在、日本国内には動物用診断薬の認可を受けたAGID試薬は無く、2022年の馬防疫検討会専門会議において診断精度が評価された海外製品のうち、3製品が使用可能となっている。内訳は、VMRD社（米国）、IDVet社（フランス）、NECVB社（中国）で、いずれも抗原には馬伝染性貧血ウイルス（EIAV）の組換えp26蛋白質が用いられている（図5）。



図5 海外製AGID試薬3種の外装

実験感染馬の経過血清および野外血清を用いた評価において、3製品の検査結果は全て一致し、診断精度に大きな差はないが、沈降線の濃さやコントラストに関しては製品ごとに若干の違いが見られる（図6）。

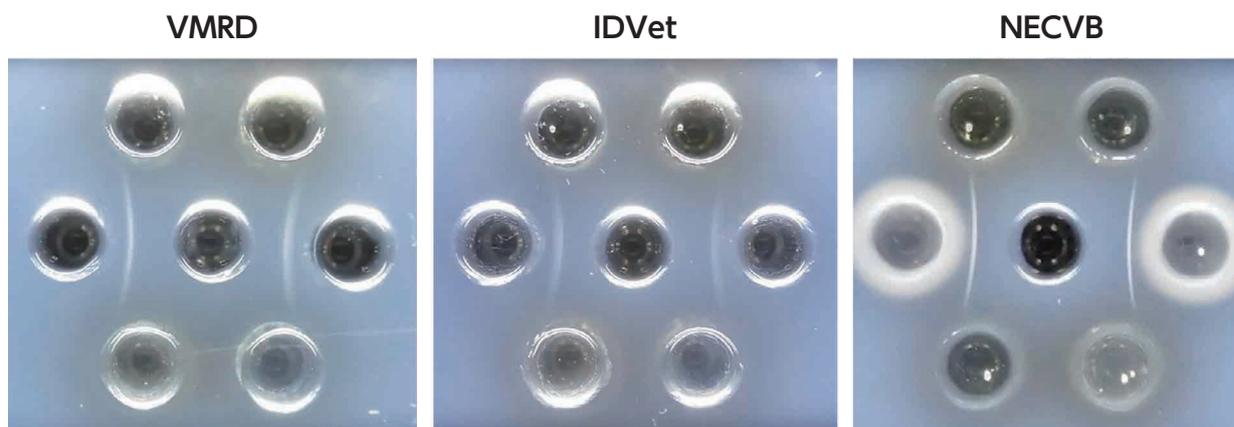


図6 海外製AGID試薬3種による標準沈降線

植え込み

- ゲル、試薬、血清を全て室温にする。穴をあけてから時間の経ったゲルでは、穴の中に水分が溜まっている場合があるため、マイクロピペットで吸い出してから使用する。
- 周りの6穴のうち、左上、右上、右下、左下に被検血清を50 μ Lずつ入れる。左、右の2穴に陽性指示血清、中心の穴に抗原液を50 μ Lずつ入れる(図7)。⁴⁾
- 余った穴には被検血清またはホウ酸バッファを入れ、空の反応穴を作らない。

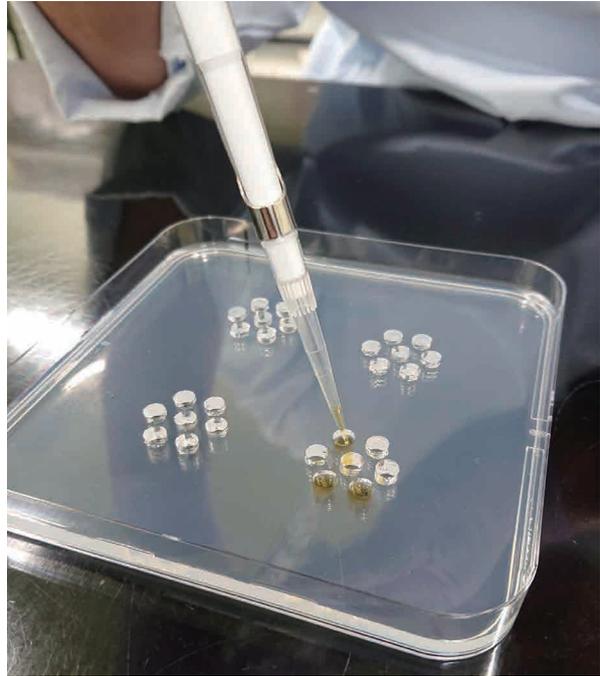


図7 血清の植え込み作業

4) この配置は、旧家畜伝染病予防法(「旧家伝法」という)施行規則記載の方法に則ったもので、配置が単純でミスが起きにくく、また検体数の多い場合に便利である。一方、WOAHマニュアル記載の方法では、周りの6穴のうち1穴おきの3か所に陽性指示血清を入れる(図8)。この方法は、一度に検査できる検体数が少ないが、被検血清が常に両側2か所の陽性指示血清に挟まれているため、標準沈降線との融合の有無を判定しやすくなるメリットがある。

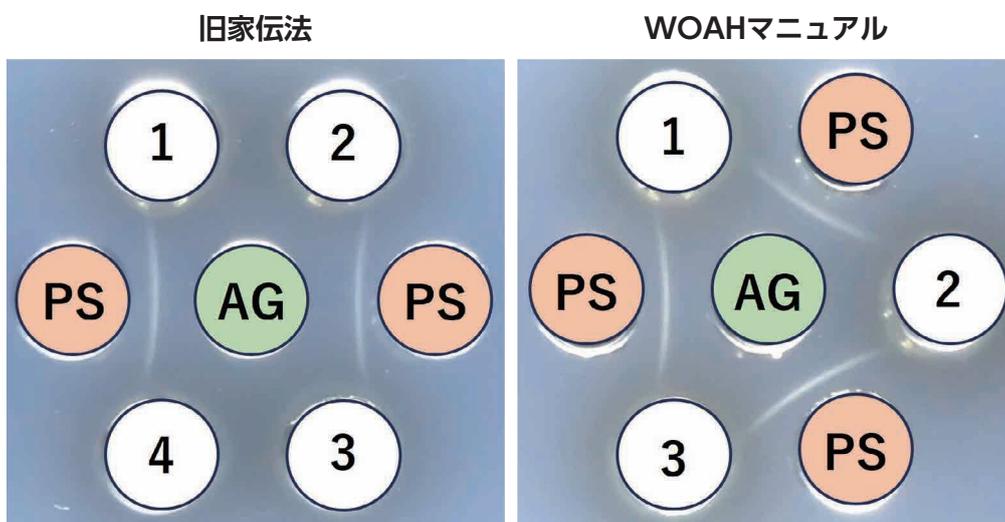


図8 旧家伝法とWOAHマニュアルにそれぞれ記載された試薬・血清の配置
(AG: 抗原、PS: 陽性指示血清、1~4: 被検血清)

- プレートに蓋をして、湿度を保つために反応箱に入れる。隙間に湿らせたペーパータオル等を置き、乾燥を防ぐ（図9）。
- 室温（18～26℃）で24～48時間反応させた後、暗室でイムノビューワーを用いて観察する（図10）。



図9 反応箱



図10 イムノビューワー

判定と記録

検査が成立するためには、抗原と標準陽性血清との間に標準沈降線が形成されなければならない。標準沈降線を確認した後、抗原と被検血清との間に沈降線が形成されるか、沈降線の状態により、陽性あるいは陰性の判定を行う。判定用紙には、使用した試薬のロット、プレート番号、植え込みを行った日付・実施者、判定を行った日付・実施者を証左として記録する。以下にJRA競走馬総合研究所で使用している判定用紙（図11）、および判定基準となるいくつかの例を紹介する（図12～18）。

AGID判定用紙

Lot No. 植込日 判定日
 Plate No. 担当者（ ） 担当者（ ）

① ②	⑤ ⑥	⑨ ⑩
③ ④ ⑦	⑧ ⑪ ⑫	⑬ ⑭ ⑯
⑰ ⑱	⑲ ⑳	㉑ ㉒
㉓ ㉔ ㉕	㉖ ㉗ ㉘	㉙ ㉚ ㉛
㉜ ㉝	㉞ ㉟	㊱ ㊲
㊳ ㊴ ㊵	㊶ ㊷ ㊸	㊹ ㊺ ㊻
㊼ ㊽	㊾ ㊿	

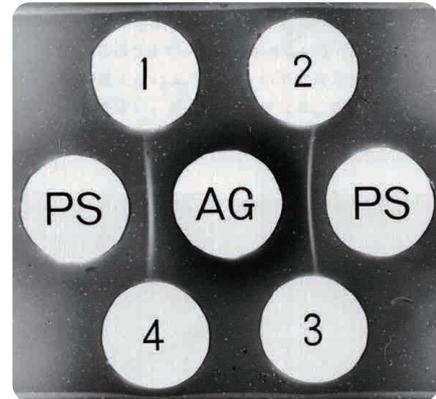
well	検体番号	判定	well	検体番号	判定	well	検体番号	判定
1			13			25		
2			14			26		
3			15			27		
4			16			28		
5			17			29		
6			18			30		
7			19			31		
8			20			32		
9			21			33		
10			22			34		
11			23			35		
12			24			36		

図11 判定用紙の例

判定基準

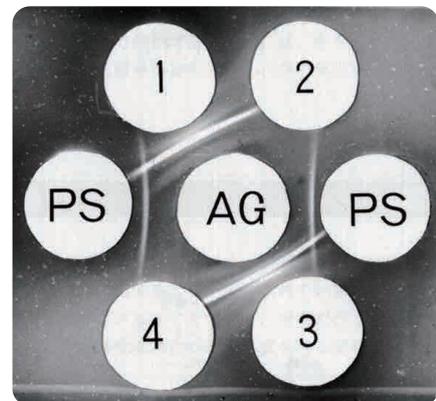
陰性（典型例）（図 12）

血清 1～4 と抗原の間に標準沈降線と融合する沈降線が認められず、標準沈降線が外反して被検血清を注入した穴に接近している、または突き当たっている。



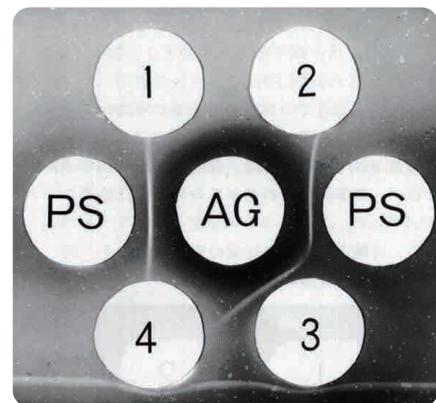
陰性（非特異反応）（図 13）

血清 1 および 3 と抗原の間の沈降線は、標準沈降線と融合せず交差しているため、ウイルス抗原との反応ではなく陰性と判定できる。これは被検血清が抗原に含まれるウイルス抗原以外の成分に対する抗体を有している場合に生じる。



陽性（典型例）（図 14）

血清 3 と抗原の間に明瞭な沈降線が生じ、その末端は標準沈降線と融合する。



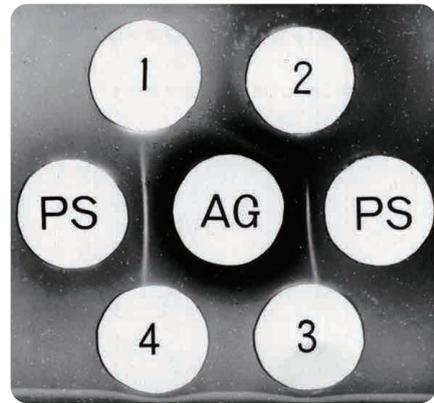
陽性（弱陽性例）（図 15）

血清 3 と抗原の間に明瞭な沈降線は生じないが、標準沈降線の下端が内側へ曲がっている。このような沈降線は感染初期の血清抗体価が低い場合に認められるため、日数を置いて再度採血・検査することが推奨される。



陽性（強陽性例）（図 16）

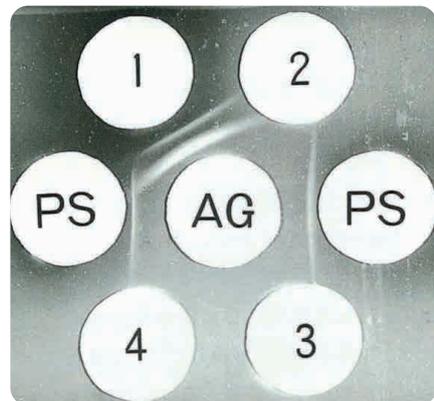
血清 2 と抗原の間の抗原寄りに幅が広い不鮮明な沈降線が形成され、末端は標準沈降線と融合する。このような沈降線は血清抗体価が高い場合に認められるため、被検血清を生理食塩水やホウ酸バッファーで 2 倍～8 倍希釈して再検査を行うと、いずれかの血清希釈で明瞭な沈降線が観察される。



非特異反応との共存例 1

（陽性と判定される例）（図 17）

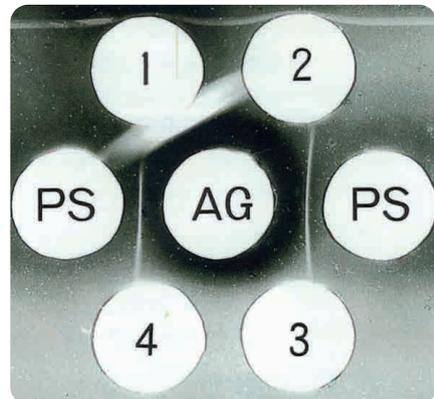
血清 1 と抗原の間に沈降線が複数生じ、そのうち 1 本は標準沈降線と融合しているため、陽性と判定される。



非特異反応との共存例 2

（明確に判定できない例）（図 18）

血清 1 と抗原の間で沈降線が複数生じているが、非特異反応の沈降線と陽性の沈降線が重なり、判定が困難である⁵⁾。強陽性例と同様に血清を希釈して再検査することで、明瞭な沈降線が認められる場合があるが、抗体価が低い場合には判定が困難である。このようなケースでは、日数を置いて再度採血・検査することが推奨される。



5) 精製ウイルス抗原を用いていた時代には、こうした判定困難な非特異反応例への対処法として、被検血清に牛血清を添加することが推奨されていたが、組換え p26 抗原を用いた現在の試薬においてこの方法が有用かどうかは定かでない。

おわりに

本冊子の冒頭でご紹介したように、EIA の国内清浄化に伴う検査需要の低下によって、AGID 試薬の供給体制が不安定になり、海外製試薬に頼らざるを得ない状況となりました。清浄化そのものが良いことであるだけに、何とも皮肉な結果と言えるでしょう。こうした供給問題は、診断薬に限らず治療薬やワクチンに関してもしばしば起こりますが、これは馬用の商品の市場規模が小さいためどうしても避けられない問題です。海外製品についても急に販売停止されるケースもあるため、今後も安心できる状況ではありません。将来にわたって安定的に検査を行うためには、常に複数の製品を選択肢として持つ必要があるでしょう。また、昔は多くの家畜保健衛生所で毎年 AGID が行われていましたが、検査体制の縮小によって実施する機会が減り、現在ではごく限られた機関でしか行われていません。検査術式の継承も困難と推察されるだけに、本冊子の内容が各機関で検査実務を担当される方々の一助となれば幸いです。

日本中央競馬会競走馬総合研究所 分子生物研究室

坂内 天

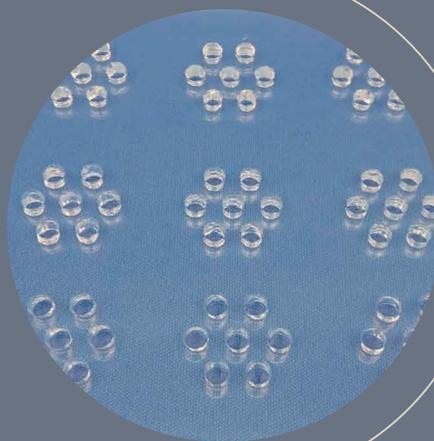
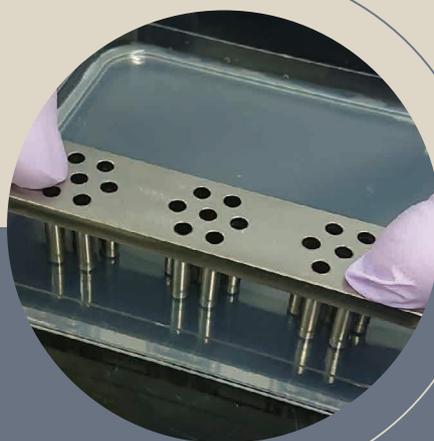
参考文献

1. Bannai H, Kambayashi Y, Nemoto M, Yamanaka T, Tsujimura K. Comparison of 4 agar gel immunodiffusion kits for serologic detection of equine infectious anemia virus antibodies. *J Vet Diagn Invest* 2023. 35:430-432.
2. Coggins L, Norcross L, Kemen MJ. The technique and application of the immunodiffusion test for equine infectious anemia. *Proc 3rd Int Conf Equine Infect Dis* 1972. 189-198.
3. Lupulovic D, Savic S, Gaudaire D, Berthet N, Grgic Z, Matovic K, Deshiere A, Hans A. Identification and genetic characterization of equine infectious anemia virus in Western Balkans. *BMC Vet Res* 2021. 17:168.
4. Nakajima H. Immunodiffusion studies in equine infectious anemia and their evaluation for diagnosis. *Proc 3rd Int Conf Equine Infect Dis* 1972. 199-214.
5. Nemoto M, Yamanaka T, Bannai H, Tsujimura K, Ueno T, Mekata H, Yoshida A, Koyama A, Kokado H. Comparison of two agar gel immunodiffusion protocols for diagnosing equine infectious anemia. *J Vet Med Sci* 2018. 80:1245-1247.
6. Pare J, Simard C. Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assays and agar gel immunodiffusion tests for the serodiagnosis of equine infectious anemia. *Can J Vet Res* 2004. 68:254-258.
7. WOAHA Terrestrial Manual 2019. Chapter 3.6.6. Equine infectious anemia. In: *Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals*, WOAHA, Paris.
8. 馬防疫検討会「馬伝染性疾病清浄度評価専門会議（馬伝染性貧血）」報告書、2017年
9. 馬防疫検討会「馬伝染性貧血診断のためのゲル内沈降反応に関する専門会議」報告書、2019年
10. 馬防疫検討会「馬伝染性貧血診断のためのゲル内沈降反応に関する専門会議」報告書、2023年

図 12～18：「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」
（中島英男著、軽種馬防疫協議会、1976年）より転載

日本中央競馬会畜産振興事業

地方競馬全国協会畜産振興補助事業



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
令和7年8月	第4版第1刷発行

公益社団法人 中央畜産会

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