



豚丹毒の抗体検査法について

はじめに

豚丹毒の抗体検査は、ワクチン関係の研究資料では「生菌凝集反応(Growth Agglutination; GA)」で実施されているものが多いようです。ただし、生きた菌を無菌的に培養しながら行うこの方法は検査ラボでも敬遠されがちで、臨床現場では危険でなく簡単な「ラテックス凝集法(Latex Agglutination; LA)」が応用されている例が目立ちます。過去には「死菌凝集反応(Killed-cell Agglutination; KA)」が検討された時期もあり、その背景にはやはり「生菌凝集はいやだ」にあったようです。その他、研究レベルでは、豚丹毒菌の表層防御抗原(SpaA)を用いたELISAの報告もいくつかあります。

それぞれの検査方法がどういう特徴があって、検査結果をどう読んだらよいのか、というのが今回のテーマです。検査法と検査結果の実例を挙げてお考え頂く材料を提供致します。

※豚丹毒菌及びワクチンについては、本誌13号も合わせてご参照ください。

豚丹毒検査方法の概要

1. 死菌凝集反応(KA)

KA法はボルデテラ・ブロンキセプチカ(Bb)でも実施されている方法で、死菌抗原に対する抗体が存在すればその抗体が「接着剤」になって死菌抗原が凝集し、その有無を目視で判定する方法です。豚丹毒菌では戦前から1970年代まで検討された時期がありましたが、抗原そのもので凝集が起こりやすく(非特異反応)、特異性や結果の信頼性を担保する「抗原の安定的な保存方法」が難しいという問題が報告されています⁽¹⁾。使用する菌株を変更してみるなど多くの努力が払われたそうですが、結果として普及しませんでした。その意味で豚丹毒菌のKA法は過去の遺物なので、ここでは経緯のみの説明にとどめます。

2. 生菌凝集反応(GA)

血清中に豚丹毒菌に対する特異抗体が存在すれば生菌が初期の段階で凝集し増殖が抑制されることがこの検査法の原理です。GA法は豚丹毒菌のみで実施されています。判定方法はKA法と同じく、凝集の有無を目視で行います。「特異性が高く反応が鋭敏」という長所の反面、「強毒株の生菌培養」は無菌操作が必要で、病原体＝危険なものを扱うリスクがあり、結果が出るまで時間がかかるという短所があります⁽¹⁾。将来はELISAに取って代わるとは思いますが、現時点では最も信頼性の高い方法です。

3. ラテックス凝集法(LA)

市販品は、豚丹毒菌のアルカリ抽出物(抗原)を球状のラテックス*粒子に結合させたもので、豚丹毒菌に対する抗体

が存在すれば抗原と接着して粒子同士が凝集し、その現象を目視で判定できるという原理に基づきます。1日で結果が得られ、安全で無菌操作も必要ない長所があります。反面、GA法やSpaA-ELISA法と一致しない(非特異反応)との報告⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾があります(弊所でも経験;後述)。独自に調製したLAキットでは「GA法とよく相関する($r=0.84$)」という研究報告⁽⁵⁾もあり、一概に言えませんが、どういう場合が非特異抗体でどういう場合が特異抗体なのか区別がつかないため、結果の読み方が難しいかもしれません。

* ;ポリスチレンというプラスチックでできている。ポリスチレンは発泡スチロールの素材でもある。

4. SpaA抗原によるELISA

豚丹毒の表層防御抗原(SpaA)をELISA用の抗原として用いた方法です。ただし、市販されていませんので、現時点では臨床現場で利用することはできません。ELISAですので、系の組み方次第で免疫グロブリンのどのサブクラスを検出するか、如何様にも設定できます。一般的にはIgG検出系が多いと思います。当たり前ですが、十分に精製されていない抗原では非特異反応が出現しやすく、「実験用のSPF豚でも“陽性”と判定される」⁽²⁾という例が報告されています(この場合、豚丹毒菌の超音波抽出抗原が使用された。本論文の主旨は「組換えSpaA抗原を使用すれば一定品質の抗原調製が容易で有用なELISAが構築できる」という内容)。

ELISAの場合、一般的に非特異反応ができるだけ出ないようにするために、使用する抗原に組換え抗原を使用するか、抗原を高度精製するとか工夫されます。使用抗原の精製度まで普通は公表されませんので、非特異反応の出現する範囲についてどの程度検討されているかその結果で評価しておいた方がよいと思われます。

各検査法の比較検討例

上述のとおりKA法は無視するとして、GA法、LA法、SpaA-ELISAを同一血清で比較検討された事例がいくつかありますので、結果だけ引用して考察してみたいと思います。

1. 今田ら(GA、LA、ELISA比較)⁽²⁾

報告では、「ワクチン未接種の実験用SPF豚の抗体検査で、精製SpaA-ELISAでは清浄度と一致したが、LAでは全頭が清浄度と全く相反する非常に高い(64倍前後)抗体価を示した」「敗血症集団発生農場の抗体検査で、精製SpaA-ELISAでは「発生するには抗体陰性の多数の感受性豚の中に少数の保菌豚が存在する状況」を正確に反映している結果だったが、LAではワクチンを長年使用していないにも関わらずほとんどの豚が高い抗体価を示し、これが感染

防御抗体とすればたくさんの豚が敗血症死した状況と矛盾する結果だった」とあります。(蛇足ですが、非精製SpaA抗原によるELISAもLA同様、豚群の状態を表さない結果(非特異反応)だったそうです。

2. 野末ら(GA, LA, ELISA比較)⁽³⁾⁽⁴⁾

「9農場148検体についてGA, LA, SpaA-ELISAによる抗体検査を比較した結果、LAは99%が陽性、GAとELISAは60%以上が陰性と一致しなかった(GAとELISAはほぼ一致)」「GAとELISAでは抗体陽性検体の多くがワクチン接種豚か繁殖豚で農場の状態を反映する」「防疫対策としてGAかSpaA-ELISAが必要(SpaA-ELISAは入手不可ゆえGAで実施すべき)」とのことです。

3. 井原ら(GA, LA)⁽⁶⁾

この報告は、と畜検査において豚丹毒菌による関節炎が疑われたとき、関節腔液中のGA抗体価を感染の指標とされており、LA法が追加で検討された、というものです。結果は、「関節腔液をそのままLA検査すると非特異反応で適正な判定ができなかった」「関節腔液を硫酸アンモニウム処理するとGAの結果と高い相関性があり、菌分離成績とも一致した」とのことです。「硫酸アンモニウムで処理する」という情報は血清にも応用できそうですが、今後の検討課題でしょう。

4. 化血研(GA, LA)⁽⁷⁾

弊所では、一貫してLAは非特異反応が出やすいことを経験しています。いくつか抜粋してご紹介致します。

(1) 事例1

野外農場(A農場)のラテックス凝集抗体価を測定された事例で、豚丹毒生ワクチン接種前(35~50日齢)に抗体が上がっている結果から野外感染が疑われていました(図1)。しかしながら、50日齢前に豚丹毒を疑う症状もなく、念のために再度採血をお願いしてGA抗体価の測定したところ、同じ日齢で野外感染を疑うような抗体上昇はなく、その後もワクチン接種後に低い抗体応答があっただけでした(図2)。

LAで測定した血清とGAで測定した血清が異なりますので厳密には比較できませんが、もし汚染農場であれば高い抗体価の豚がいるはずだが・・・と見るのが普通です。LAを信頼すれば「生ワクチン投与前に感染しており移行抗体の残存する早期から不活化ワクチンを投与すべき」となるし、GAを信頼すれば「移行抗体は50日齢前後で減衰するので70日齢で生ワクチン投与はほぼ適切、ワクチンの抗体応答は低いものの感染を疑う所見なし」となります。皆さんはどちらが確からしいと思いますか?

(2) 事例2

頂いた野外農場(B農場)のLA抗体価の測定結果が図3・図4上です。臨床所見と食い違う結果だったので同一血清についてGA抗体価の測定依頼があり、その結果が図3・図4下です。B・C農場でもA農場同様の評価結果です。この農場は母豚接種なしであり、GAでは「移行抗体なし」がほぼ正しく表現されていますが、LAでは谷間が見えず「すでに感染している」と評価してしまいます。

そのほか、今田ら⁽²⁾の報告にもあったように、実験用のSPF豚でもGA陰性なのに、LA抗体陽性を確認しています。

最後に

今回は豚丹毒に対する抗体検査についてご紹介しましたが、「生物材料を用いる抗体検査は、多かれ少なかれの検査でも非特異反応があり得る」と考えておいた方がよいかもしれません。抗体検査に使用する抗原の種類・精製度や生物活性で出てくる結果が異なることはあり得る話だからです。だからこそ、疑問に感じたときに別の方法、別の角度から検査してみることが重要だと思います。例えばPRRSVでは、

陰性農場をELISAで検査すると少ないが陽性が出るのが経験され問題となりましたが、変法ELISAか全く別の方法で判定することで対処されたと聞いています。

「検査結果をどう読んだらよいか」が抜け落ちてしまいましたが、移行抗体やワクチン投与後の抗体応答の推移がちゃんと表現されているか、つじつまは合うか、先の報告のとおり農場の感染状態を正確に反映しているか、など全体像をまず掴んでください。個別別には、2ME(+)GA抗体価で4倍あれば防御可能、ただし4倍未満でも豚丹毒生ワクチンでは善感反応があればよく、さらに2ME(-)で16倍以上あれば有効、と評価基準が複雑なので複眼で評価して頂ければ幸いです。GAは、非特異反応陽性は少ないものの、2ME(-)では低い抗体価ではあり得るし、2ME(+)では逆に抗体価が低く表現されて不安になることがあるかもしれません。その意味で総合的に考えれば、2ME(-)GAがわかりやすいかもしれません。

豚丹毒LA法は、非特異反応というマイナス面を補正できさえすれば、簡便で有用な方法と考えられます。その方法については十分検討されていないようです。広島県の関節腔液の発表を参考にすれば、血清処理の検討の余地がありそうですので、今後の検討が待たれます。

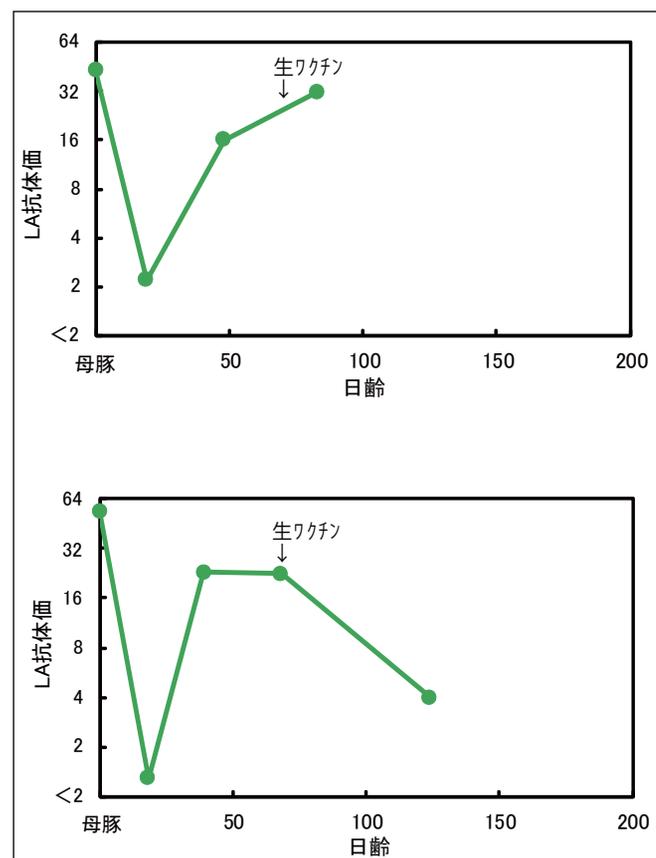


図1 A農場における豚丹毒LA抗体価の推移(同一豚の追跡調査)
(上8/24~10/27、下11/30~3/16) 70日齢で豚丹毒生ワクチンを接種

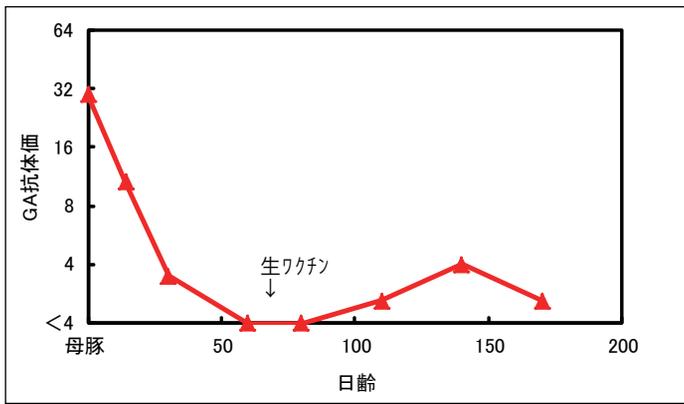


図2 A農場における日齢別豚丹毒生菌凝集抗体価 (4/11に同時採血)
(2-メルカプトエタノール処理あり; 2ME (+))

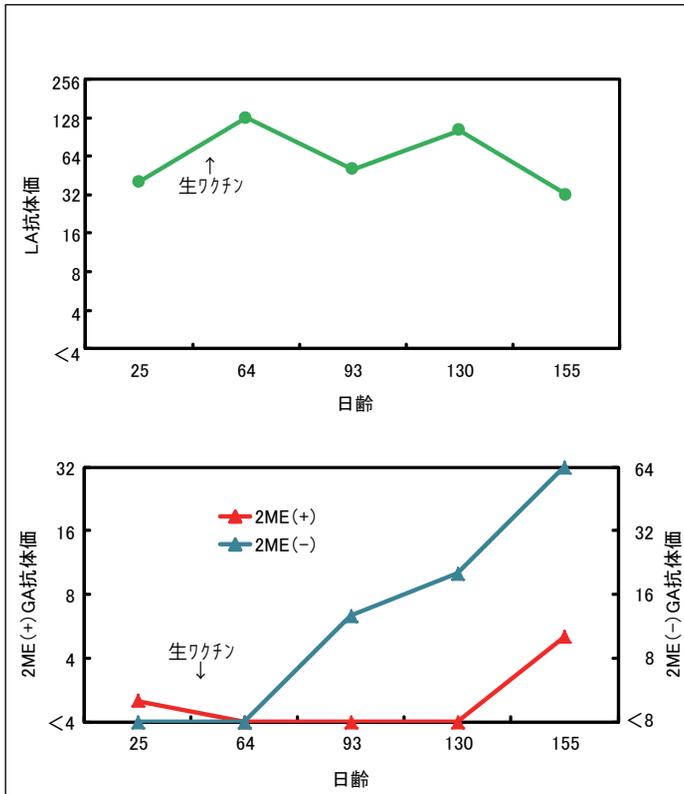


図3 B農場における日齢別豚丹毒抗体価 (上LA、下GA)
豚丹毒生ワクチンを35～50日齢で接種 (母豚は接種なし)

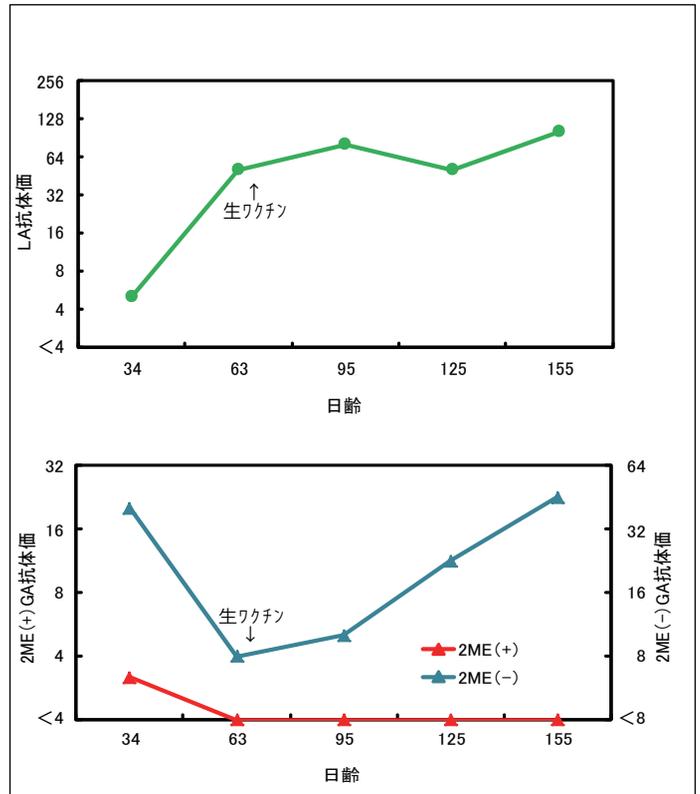


図4 C農場における日齢別豚丹毒抗体価 (上LA、下GA)
豚丹毒生ワクチンを70日齢で接種 (母豚接種あり)

参考文献

- (1) 沢田ら, 動薬検年報, 15, 3-11, 1978
- (2) 今田, 豚病会報, 39, 19-23, 2002
- (3) 野末ら, 家畜衛生学雑誌, 35(2), 47-50, 2009
- (4) 野末, 臨床獣医, 30(3), 17-21, 2012
- (5) Satoら, J. Vet. Med. B, 45, 407-20, 1998
- (6) 井原ら, 全国食肉衛生協議会, 平成12年度
- (7) 化血研資料