

血清凝集反応を応用した抗体検査による牛サルモネラ症サーベイランス

河合浩二、上條明良、塩沢道雄、荻原正義
(伊那家畜保健衛生所)

はじめに

近年、牛におけるサルモネラ症が急増し、酪農家を中心に大きな被害をもたらしている¹⁾。管内でも、平成4年に2戸、8年に1戸の酪農家で *Salmonella* Typhimurium (以下、ST) 症の集団発生があり、大きな被害をもたらした^{2,3)}。サルモネラ症の防除には、本菌の浸潤状況の把握が不可欠だが、細菌検査によるサルモネラの分離には、多大な時間と労力を要するため、多数の検体を短期間に検査するのが難しく、広範囲の浸潤状況の調査はされていないのが現状である。そこで今回、手技が簡便で、短期間に多数の検体処理が可能である、血液を用いた抗体検査により抗体価からST、あるいは *Salmonella* Dublin (以下、SD) 感染の有無を高い確率で推定できるとして報告されたマイクロ凝集反応による抗体検査^{4,5)}を実施して、本法によるサーベイランスの有用性について検討したので、その概要を報告する。

材料と方法

検査1 抗体検査に用いる検査手技(マイクロ凝集反応)の有効性を確認するため実施した。検査材料は平成8年11月にST感染症の集団発生があったA農場の、平成9年5月26日に採材した28検体、および平成9年11月12日に採材した牛血清24検体を用いた。

検査2 管内酪農家におけるサルモネラ浸潤状況の把握のために、平成9年度ブルセラ病検査の残余血清1574検体(過去にサルモネラ症の発生があった2農場を含む64農場)を用い実施した。

マイクロ凝集反応 供試血清は2-メルカプトエタノール(以下、2ME)処理を施した。血清の2ME処理は、血清と2ME液(2ME50 μ lをVBS3.2mlで希釈して作成)を1対3の割合で

混合し、37 $^{\circ}$ Cで75分間湿室に静置することによって行った。処理血清はU底96穴マイクロタイタープレートを使用し、VBSで2倍段階希釈した。抗原には市販の「馬パラチフス急速診断用菌液(千葉血清研究所)」を40倍に希釈したものを用いた。室温で1夜静置反応後、判定はイムノビュアを用いて判定した。抗原のすべてがウェルの底面に集積するものを陰性、抗原がウェルの底面に一様に分布するものを陽性として、陽性を示す最高希釈倍数を抗体価とした。32倍以上で凝集したものをST、あるいはSD、もしくは両方の抗体に陽性とした。

結果

検査1 表1にA農場における抗体検査成績を示した。平成9年5月26日採取材料では抗体価は8倍未満から512倍を示し、32倍以上の割合は89%(25/28頭)であった。一方、平成9年11月12日採取では抗体価は8倍から256倍を示し、32倍以上の割合は75%(18/24頭)だった。

検査2 表2に管内64農場1574頭の抗体検査成績を示した。各農場における抗体陽性率は0%から27%を示した。牛群の抗体陽性率が20%以上を示した農場は3戸、10~19%が8戸、1~9%が14戸、0%が39戸だった。抗体陽性牛が1頭以上存在する農場の割合は39%(25/64戸)であった。平成4年にサルモネラ症の集団発生があった2農場では抗体陽性率はそれぞれ20%、16%であった。検査全頭における陽性頭数の割合は5%(82/1574頭)であった。検査した地域を旧市町村単位で7地区に分けた成績では、各抗体陽性率は0%から11%を示した(表3)。北海道導入牛、管外導入牛、および管内産牛における抗体陽性率はそれぞれ3%(4/122頭)、7%(1/14頭)、5%(77/1438頭)であった。

表1 . A農場におけるS T , S D抗体検査成績と頭数

採材 年月日	検査 頭数	抗体価								陽性率 (%)	GM価
		<8	8	16	32	64	128	256	512		
9. 5.26	28	1	1	1	6	9	7	1	2	89	69
9.11.12	24	0	5	1	8	6	2	2	0	75	37

表2 . 管内64農場のS T , S D抗体検査成績と頭数

農場 No.	飼養 頭数	検査 頭数	抗体価				抗体陽性 率(%)
			8	16	32	64	
1	27	26	15	4	6	1	27
2	28	25	12	7	3	3	24
3 *	77	75	52	8	11	4	20
4	21	21	12	5	3	1	19
5 **	43	43	29	7	5	2	16
6	14	14	9	3	2	0	14
7	26	25	19	3	2	1	12
8	26	26	22	1	2	1	12
9	37	35	22	9	2	2	11
10	9	9	8	0	1	0	11
11	59	59	49	4	4	2	10
12	11	11	10	0	1	0	9
13	52	47	32	11	4	0	9
14	14	13	9	3	1	0	8
15	65	59	52	3	4	0	7
16	32	32	23	7	2	0	6
17	35	33	24	7	2	0	6
18	17	17	13	3	1	0	6
19	35	35	31	2	2	0	6
20	45	43	41	0	2	0	5
21	30	30	27	2	1	0	3
22	32	32	25	6	1	0	3
23	41	40	34	5	0	1	3
24	47	46	38	7	1	0	2
25	59	57	49	7	0	1	2
26	6	6	6	0	0	0	0
27	27	27	27	0	0	0	0
:	:	:	:	:	:	:	:
63	30	30	27	3	0	0	0
64	14	14	14	0	0	0	0
計 64戸		1574	1338	154	63	19 (頭)	

* : 平成4年6月 S T症発生

** : 平成4年10月 S T症発生

表3 . 地区別ST、SD抗体陽性率

地区	農場数	検査頭数	陽性率(%)
イ	13	556	5
ロ	3	71	0
ハ	6	115	1
ニ	3	46	0
ホ	3	38	0
ヘ	9	167	11
ト	5	114	6

考察

検査1の成績から、平成8年にサルモネラ症が発生したA農場は発生から6ヶ月、および1年後においても牛群のST、SD抗体価は高く維持され、マイクロ凝集反応はサルモネラ発生農場において高い感受性を示し、サルモネラ感染の1つの検査方法として十分信頼できるものと考えられた。発生農場における抗体価の長期間にわたる消長について調査した報告は見あたらないが、同農場では平成9年5月以降再発症牛はなく、糞便検査で排菌が確認されていないことから(未発表)、6ヶ月間で牛群の抗体価は低下傾向にあるものの、発症後1年間は高い抗体価が維持されるものと推察された。

検査2で、発生から5年を経過した2農場において、牛群のST、SD抗体陽性率は他の発生が確認されていない農場と比較すると高値を示し、サルモネラ症の発生農場ではいずれも牛群の抗体陽性率が高値を示すことが判明した。一方、中野らは、マイクロ凝集反応で発生農家のST、およびSD感染牛の発症期、および発症後1ヶ月後の抗体価を検査し、両者に顕著な抗体価の上昇を認めた⁴⁾。したがって、抗体陽性率の高さから、現在、あるいは過去に比較的大規模なサルモネラ感染がある、あるいはあったことを推定できると考えられた。

このことより、他の数戸の農場において、発生農場と同レベルの高い抗体陽性率が認められたが、これらの農場では今現在感染中か以前に浸潤していたことが疑われ、今後細菌検査を実施して汚染の有無を確認し、継続的に監視すべき農場と思われた。

抗体陽性牛が1頭でも認められた農場は、全体の39%を占め、本菌が予想以上に広範囲に浸潤していることが推察された。地区別の浸潤状況をみると、清浄地区、汚染地区に分けられ、地区ごとに浸潤状況の異なることが推察された。導入牛の抗体価は管内産牛のそれと大きな違いがみられなかったが、汚染源になる可能性をふまえ、新たな監視が必要と思われた。

サルモネラ感染牛では不定期に排菌のある間欠的排菌牛やSD感染牛のように排菌しない潜在保菌牛の存在が問題となっている¹⁾。しかし、SD保菌牛の摘発には、間接ELISA法を用いた抗体検出法が、菌分離成績との一致率は高く、糞便検査法よりも有用である^{1,6,7)}とする報告があり、また、報告例は少ないが、糞便検査では摘発出来なかったSD保菌牛をマイクロ凝集反応を用いた抗体検査により摘発した事例⁵⁾も報告されていることから、潜在保菌牛の摘発には、これらの血清学的診断法は特に有用であると思われた。

中野、中岡らは、馬パラチフス菌を抗原として使い、STおよびSD両感染牛に有意の抗体価の上昇を認め、さらにSDのホルマリン不活化抗原を用いた抗体価と比較して、ST、SD感染の区分も可能である^{4,5)}と述べている。今後は、さらにSD抗原を用いた抗体検査を行ない、ST、SD感染の区分が必要と思われた。

サルモネラ浸潤調査では、従来から細菌検査が行われているが、多くの時間と労力を必要とするため、広い地域を満遍なく調査することが困難である。しかしながら、マイクロ凝集反応は、手技が簡易で、しかも多数の検体を短時間で検査できるので、本法をスクリーニング検査として活用することによって、広域、多頭検査が可能になると思われた。そして、同検査で陽性の個体、および汚染の疑われる牛群に対し細菌検査を行って、保菌牛を摘発し、事前の発生予防対策をとることによって、より効率的にサーベイランスを実施できると考えられた。

今後は今回の結果に基づいて細菌検査を実施し、保菌牛の早期発見に努めるとともに、マイクロ凝集反応検査成績と関連づけること

によって、同法がサーベイランスの手法として定着するようさらに検討を加えて行きたい。

参考文献

- 1) 佐藤静夫：しゃくなげ会報51 21-24 (1995)
- 2) 小嶋義登、林 健、小林寿夫、中田基家：長野県畜産技術研究発表集37 69-73 (1993)
- 3) 塩入 哲、河合浩二、江塚善三、荻原正義：長野県畜産技術研究発表集41 44-47 (1997)
- 4) 中野良宜：家畜衛生研修会抄録185 (1996)
- 5) 中岡祐司、山本章子、中野良宜：北海道細菌学会研修会抄録 (1997)
- 6) 橋本和典：動生協会会報27 1-12 (1994)
- 7) John K. House, Bradford P. Smith, George W. Dilling; Lin Da Roden: Am. J. Vet. Res. 54 1391-1399 (1993)