

と畜場で豚丹毒が継続摘発された一肥育農場の衛生対策と抗体検査手法の検討

県中央家畜保健衛生所

辻 寛子 山本 禎
竹前 愛子 荒井 眞弓
宮下 泰人 前田 卓也

はじめに

豚丹毒は、豚丹毒菌の感染による疾病で、豚に急性敗血症、亜急性蕁麻疹、慢性関節炎及び心内膜炎を引き起こす³⁾。豚丹毒は人畜共通感染症であり、と畜検査で豚丹毒が発見もしくは菌分離された場合は、とさつ禁止や全部廃棄になる¹⁾ため、養豚経営において経済的被害の大きい疾病である。

平成24年12月以降、管内の一肥育農場から出荷された豚で、と畜検査時に関節炎型や心内膜炎型の豚丹毒が継続して摘発された。この事例に対して衛生対策及び抗体検査を実施し、多くの知見が得られたので、その概要を報告する。

農場概要

当該農場は、肥育豚5,000頭を飼養する大規模農場で、系列繁殖農場より約30日齢の子豚を週約250頭導入していた。畜舎は、ピギーパーラーや肥育舎が計19棟、出荷日齢は、約190日齢、県内のと畜場へ毎月約1,000頭出荷していた。ワクチン接種は、豚丹毒、豚マイコプラズマ性肺炎、豚胸膜肺炎、PCV2、PRRSを実施していた。

豚丹毒発生状況

当該農場における過去の豚丹毒の発生は、平成22年6月、平成23年7月、平成24年7月と毎年1頭程度の関節炎型豚丹毒が散発的に認められていた。しかし、平成24年12月から平成25年9月までの9

ヶ月間に渡り、蕁麻疹型、関節炎型及び心内膜炎型の豚丹毒が計30頭発生した（図1）。

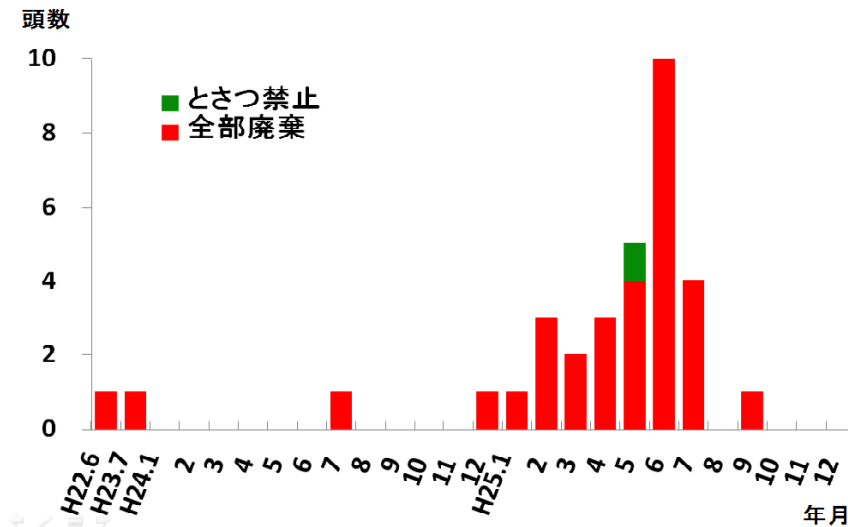


図1 豚丹毒の発生状況（平成22年以降）

衛生対策のためのモニタリング検査

農場では、従来より豚丹毒生ワクチンを80日齢で1回接種していた。しかし、平成24年12月以降にと畜場で豚丹毒の発生が継続的に認められたことから、農場の抗体保有状況を把握し、衛生対策を講じることとした。

モニタリング検査は、発生する前の平成24年8月から終息する平成25年10月まで計9回、ワクチン接種後の効果判定を行うために100～180日齢の肥育豚計58頭を採血し、ラテックス凝集反応（日生研アグテックSE：以下、LA）を定法により実施し、凝集を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とした。

モニタリング検査による抗体の推移と豚丹毒発生状況

抗体検査結果及び豚丹毒発生状況、抗体検査結果を基に指導したワクチンプログラムを図2に示した。抗体価は三角印、豚丹毒発生頭数は棒グラフで示し、ワクチン接種内容と接種群のGMは同一色で表した。

豚丹毒が急増する前の平成24年の抗体価は、8月は16～64倍・GM36.8、11月は32～128倍・GM64.0でワクチン接種後の有効抗体価は十分と思われた。しかし、12月のGMが147.0へ上昇し、抗体価も64～256≦倍とばらつきが認められたため、生ワクチン80日齢1回接種から不活化ワクチン60日

齢及び90日齢の2回接種に変更指導した。

その後、ワクチン変更による効果が期待される平成25年3月に再検査を実施したところ、抗体価は32～128倍、GMは64.0に減少し、発生頭数も平成25年2月に比べ減少していたことから、徐々にワクチンの効果が現れ、終息するものと思われた。しかし、4月以降、発生頭数が再度急増し、5月に検査を実施したところ、抗体価は128～2048倍、GMは776.0と非常に高い値であった。このことから、農場で豚丹毒菌がまん延していると推察し、頻回ワクチン接種により免疫状態を安定化させることを目的に、不活化ワクチンの接種回数を60日齢及び90日齢の2回接種に120日齢を追加した3回接種への変更を再度指導した。指導後のGMは、徐々に低下し、発生頭数も6月をピークに減少し、9月に1頭関節炎型が確認されたのを最後に終息した。

なお、その後の畜主への聞き取り調査で、系列繁殖農場で繁殖豚に豚丹毒ワクチン接種が実施されていないことが判明し、子豚への移行抗体レベルに差があることが推測されたため、8月以降のワクチン接種は、30日齢、60日齢及び90日齢で実施した。

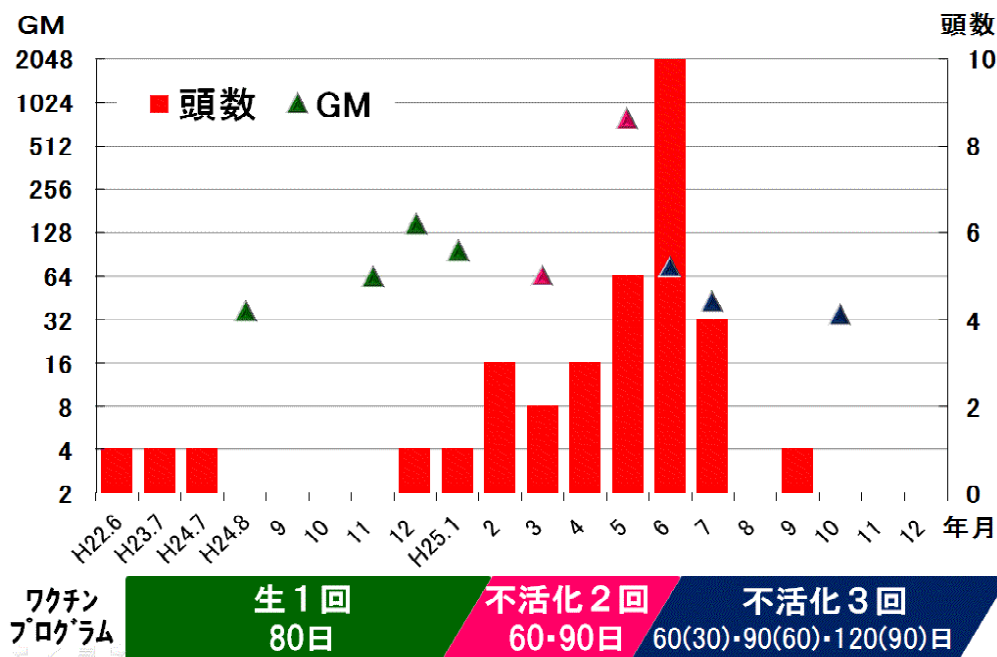


図2 豚丹毒発生状況と抗体の推移

衛生指導内容

当該農場における豚丹毒対策としては、ワクチンプログラムの見直しのほかに、系列繁殖農場における不活化ワクチン接種の徹底、畜舎消毒の徹底、有効薬剤（ペニシリン系薬剤）による異常個体の

早期治療、発育不良個体の早期淘汰、飼養衛生管理基準の遵守等を指導した。

LA検査結果の検証

今回、抗体価のばらつきを少なくするために実施した生ワクチンから不活化ワクチンへの変更や頻回接種等が功を奏し、終息することができた。

一方、ワクチン変更後の効果を確認するモニタリング検査で、出荷豚は感染を防御できる十分な抗体を保有していると判断したものの、4月以降、と畜検査で継続して発生が認められたことから、LAは農場の抗体保有状況を十分に反映できていないのではないか、という疑問が生じた。

群馬県の野末らは、農場の抗体保有状況をよりの確に把握でき、農家指導へと繋げることができる検査法として、生菌発育凝集反応（以下、GA）が有効であるとの報告¹⁰を行っている。そこで、今回の事例においてLAとGAの抗体検査を比較検討することとした。

LAとGAの比較

LAとGAの比較検討について、次のとおり実施した。

1 検査材料

- (1) 採材時期：平成24年8月～25年5月まで 計6回
- (2) 検査日齢及び頭数：100～180日齢豚の保存血清 計104頭

2 検査方法

- (1) LA：日生研アグテックSEを用いて、定法により実施
- (2) GA：マイクロプレート法

血清を等量の0.2mol/Lβ-メルカプトエタノール（2ME）添加BHI培地と混合し、37℃1時間処理した後、96穴U字マイクロプレートに2倍希釈列を作成。10%Mariefelde株添加BHI培地を添加後、37℃16～18時間培養。凝集を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とし、8倍以上の抗体価を有効抗体価と判定した。

検査結果

平成24年8月及び11月の豚丹毒発生前（以下、発生前）と平成24年12月～25年1月及び3月までの

発生初期（以下、発生初期）のL Aは、すべての個体で抗体保有が認められた。しかし、発生前のG Aでは34頭中31頭、発生初期のG Aでは45頭中22頭で抗体を保有しておらず、L AとG Aの抗体分布は異なっていた（図3、4）。一方で、平成25年5月の急増時（以下、急増時）は、L A、G Aともに大きく抗体価が変動し、抗体分布は概ね一致した（図5）。このことから、野末らの報告同様、L Aは、感染防御に必要な抗体の的確な把握が難しいと思われ、豚丹毒の抗体検査法について、さらなる検証が必要と思われた。

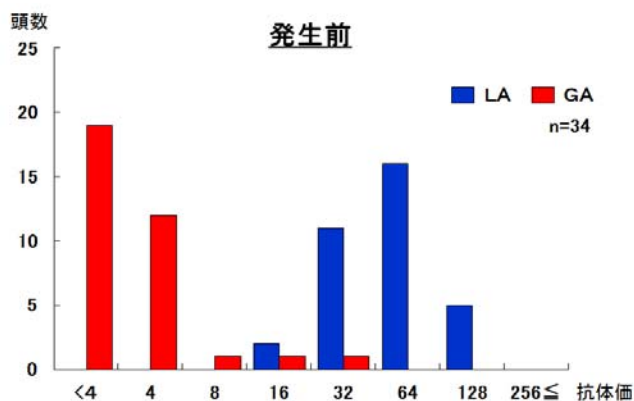


図3 LAとGAの検査結果比較（発生前）

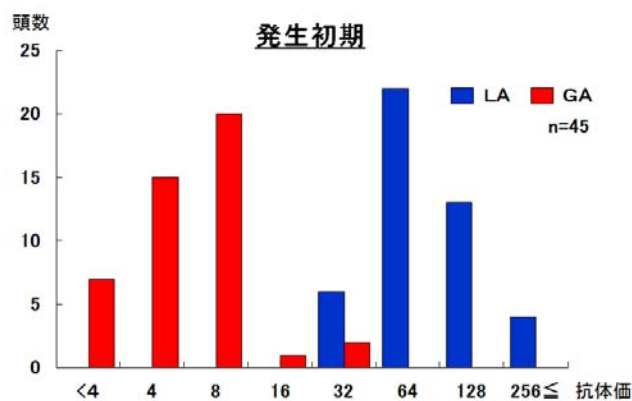


図4 LAとGAの検査結果比較（発生初期）

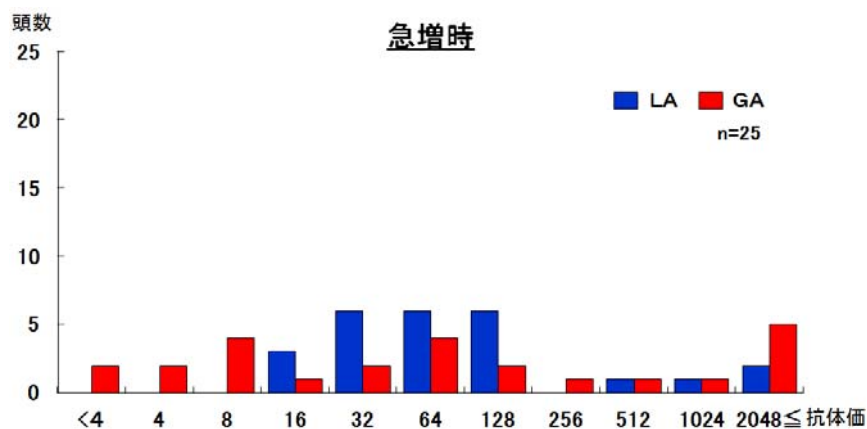


図5 LAとGAの検査結果比較（急増時）

豚丹毒抗体検査の現状

従来から実施されている抗体検査には、感染防御抗体の測定に適しているG Aと、G Aの代替法として市販されているL Aの2つがある。L Aは作業性が簡便である一方、G Aは生菌を使用するため、再現性の低さや術者への感染の危険性など問題点がある。そこで現在、よりの確な感染防御抗体の測定と作業性の問題を解決するために、2種類のELISAによる検査法が検討されている（図6）。

1 つは、感染防御抗原であるSpaAの精製組換え蛋白を抗原としたELISA（以下、SpaA-ELISA）で、SpaAに対する抗体応答を特異的に検出しているため、感度と特異性が高いとされる⁴⁾。また、野末らは、LA、GA、SpaA-ELISAの3法比較検討を実施し、GAとSpaA-ELISAは同様の結果を示し、概ね農場のワクチン接種状況や衛生状況を反映する結果であったとの報告¹⁰⁾を行っている。しかし、SpaA-ELISAは抗原作成方法が特殊であることから、実用化されていない。

一方、SpaA-ELISAの抗原検出を容易にした豚丹毒菌表層抗原アルカリ抽出ELISA（以下、アルカリELISA）は、比較的容易に抗原が作成でき、検査が実施できることから、この検査法の有用性について、他の検査法とさらなる比較検討を実施した。

なお、LAとGAは当所にて実施し、SpaA-ELISAとアルカリELISAは、独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所に検査を依頼した。

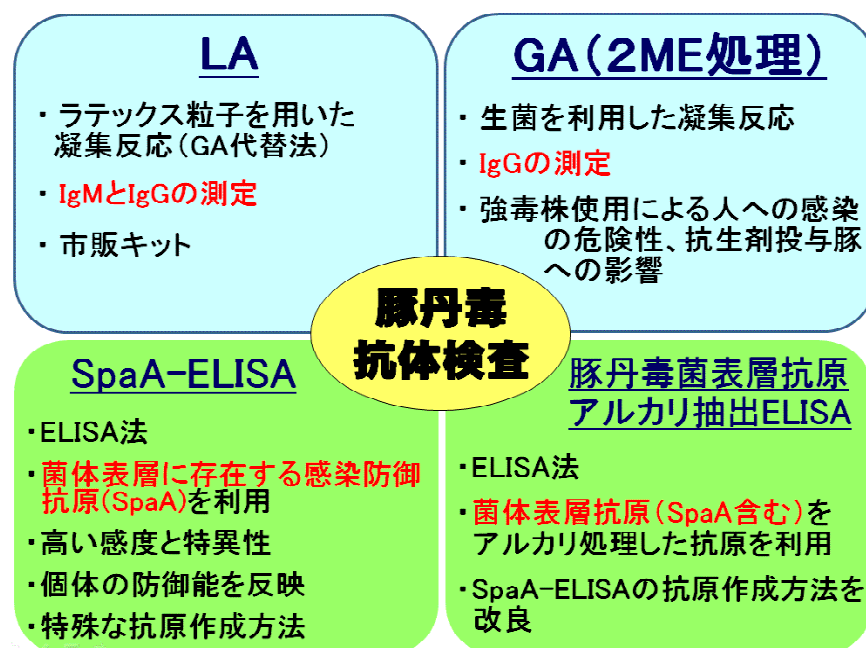


図6 豚丹毒抗体検査の現状

豚丹毒抗体検査の比較

これら4つの検査法について、次のとおり比較検討した。

1 検査材料

(1) 採材時期：平成24年8月～25年10月

(2) 検査日齢及び頭数：30～180日齢豚の保存血清をランダムに抽出した36頭

2 検査方法

- (1) LA：日生研アグテックSEを用いて、定法により実施
- (2) GA：マイクロプレート法
- (3) SpaA-ELISA⁴⁾
- (4) アルカリELISA

①抗原の調製方法

Fujisawa株（血清型1a強毒株）を0.1%Tween80添加BHIブロスで増菌培養後、菌体を回収し、PBSで洗浄する。0.01MNaOHに菌体を再浮遊後、4℃で一晩攪拌し、抗原を抽出する。遠心により菌体を除去後、抗原濃度を10μg/mlに調整する。

②ELISA法

10μg/mlに調整した抗原をELISAプレートに固相化する。被検血清は56℃30分で非働化後、100倍希釈する。この被検血清を用いてELISAを実施後、吸光度450nmで測定する。

検査結果

各検査の抗体価とOD値の分布を図7～図10に示した。

SpaA-ELISAとLAの相関は低く（相関係数；0.3216）、LAは感染防御抗体の測定に不十分であると考えられた（図7）。一方、SpaA-ELISAとGAは高い相関（相関係数；0.7498）を認め（図8）、野末らの報告¹⁰⁾と同様の結果が得られた。また、SpaA-ELISAとアルカリELISA（相関係数；0.5967）、アルカリELISAとGA（相関係数；0.6845）においても、高い相関が認められた（図9、10）。このことから、アルカリELISAは感染防御抗体の測定に適していると推察された。

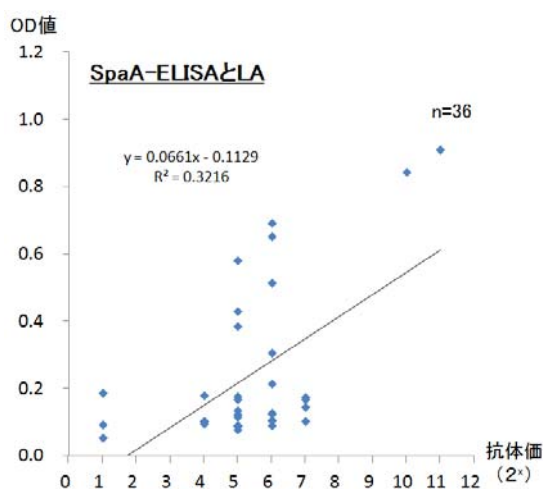


図7 SpaA-ELISAとLAの比較

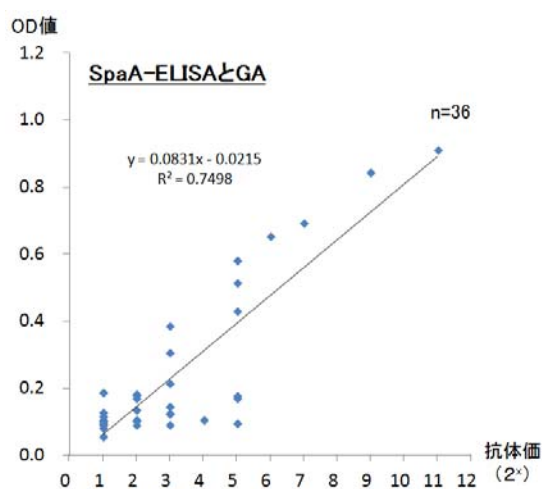


図8 SpaA-ELISAとGAの比較

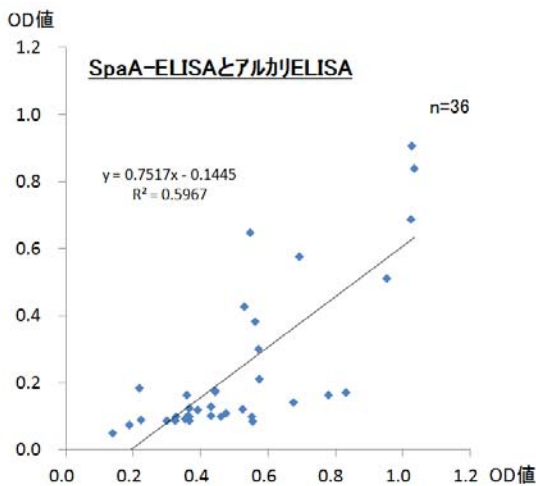


図9 SpaA-ELISAとアルカリGAの比較

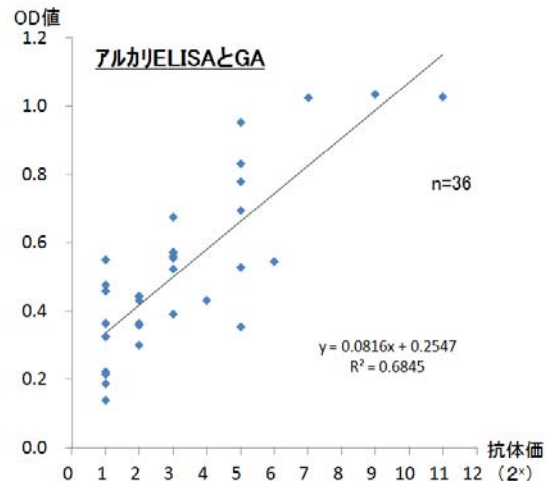


図10 アルカリELISAとGAの比較

まとめ及び考察

近年、全国では新しい遺伝子変異型の豚丹毒菌による敗血症豚丹毒の発生が報告されている(1~2、5~8)。当該農場における豚丹毒摘発事例も、新しい遺伝子型であるSpaA-609G769A型豚丹毒菌によるものであった。豚丹毒は、ペニシリン系薬剤による治療が可能であり、適切なワクチン接種により発症を防御することができる。確実な衛生対策を策定するためには、日頃から抗体検査で農場の感染防御抗体の保有状況を的確に把握することが重要である。

今回の事例は、平成24年12月以降9ヶ月間に渡り、と畜検査で慢性型豚丹毒が継続して摘発され、ワクチンを頻回接種することにより、終息できた。しかし一方で、LAのみの抗体検査では、感染防御に必要な抗体を把握することができず、適切なワクチンプログラムの確立に至らなかったことが、継続発生する一要因になったと考えられた。この理由として、LAは主にIgM(2ME感受性)を優勢的に検出していること⁹⁾が挙げられた。また、LAとGAの比較検討結果より、LAで農場における豚丹毒菌の汚染状況を把握することは可能であったが、ワクチンプログラムの効果判定や感染防御抗体を確認する際は、LAのみの抗体検査だけでなく、必要に応じてGAを組み合わせる必要があることがわかった。

GAは、感染防御抗体の測定に適している一方、生菌(強毒株)を用いることから、公衆衛生上の問題として術者へ感染の危険性が考えられ、さらには、抗生剤投与豚では菌体の発育状況が左右される、検査に4日間ほどの日数がかかる、術者により判定結果が異なる、再現性が低いなど検査精度の問題を抱えている。

一方、ELISAは目的とする感染防御抗体を測定することができ、また、抗原作成時に強毒株の感染性は消失することから、術者への安全性が担保できる。また、多検体の処理が可能で、抗生剤投与豚の検査結果への影響が少ない、検査日数が概ね1日に短縮されることなどから、GAの代替法として期待できる。

SpaA-ELISAは、感染防御抗原の測定に適しているが、抗原作成が特殊であるため一般的な検査ラボや家畜保健衛生所で実施することは困難である。一方、今回実施したアルカリELISAは、家畜保健衛生所等で抗原作成が可能であり、GA、SpaA-ELISAと同様に感染防御抗体の測定に適していたことから、有益な豚丹毒抗体検査法であると考えられた。今後さらなる検証が重ねられ、実用化されることが望まれる。

謝辞

稿を終えるにあたり、SpaA-ELISA及びアルカリELISAの実施、豚丹毒抗体検査について御助言をいただいた独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域 下地善弘先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) 福留静：平成24年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録、51～54（2012）
- 2) 福井聡子：平成24年度千葉県家畜保健衛生業績発表会集録、39～42（2012）
- 3) 飯島俊哉：豚病学＜第四版＞、342～352、近代出版（1999）
- 4) 今田由美子：豚病会報、No. 39、19～23（2002）
- 5) 神田章：獣医畜産新報 No. 11、905～909（2011）
- 6) 葛城肅仁：平成24年度福井県家畜保健衛生業績発表会集録、32～37（2012）
- 7) 栗林一博：平成23年度青森県家畜保健衛生業績発表会集録、58～61（2011）
- 8) 元村泰彦：平成23年長崎県家畜保健衛生業績発表会集録、57～60（2011）
- 9) 日生研株式会社：ナバックレター養豚版Vol. 84（2013）
- 10) 野末紫央：平成20年度群馬県家畜保健衛生業績発表会集録、14～16（2008）
- 11) 全国食肉衛生検査所協議会・編：新・食肉衛生検査マニュアル、225～232、中央法規出版（2011）