

14. HI試験によるMG抗体検査の定量化

宇佐家畜保健衛生所

○（病鑑）長岡 健朗、甲斐 千佳子、長谷部 恵理、吉田 秀幸

1. はじめに

鶏マイコプラズマは介卵感染を起こすことから、種鶏群はマイコプラズマ・フリーの状態を維持する必要がある。そのため、種鶏群では、その供用開始時に、ひな白痢検査とともにマイコプラズマ・ガリセプチカム (MG)、マイコプラズマ・シノビエ (MS) の抗体検査が行われている。近年、種鶏にマイコプラズマのワクチンを接種するようになり、従来行われてきた急速凝集反応では、微妙な程度の凝集が見られ、野外感染の有無を判断することが困難な状況になっている。そこで、今回我々は、ワクチン抗体と野外感染抗体を区別することができる定量検査法としてMGのHI試験を検討したので報告する。

2. 材料および方法

(1) 種株の分離および選定

4農場（ブロイラー2農場、採卵鶏2農場）由来の正常鶏気管スワブ70検体をFrey培地（豚血清添加）で培養した（表1）。分離された株は、最低5代のクローニングを行った後、MG特異プライマーを用いたPCR法で同定した。同定した株はHI試験に用いる抗原とするため、最もHA価が高い株を選定する目的で、それぞれの1000 50%カラーチェンジ用量（以下CCD₅₀）を5m lの培地へ接種してそのHA価を経時的に測定した。

また、選定させた種株を用いて最も高いHA価が得られる培養条件の検討も行った。

まず、保存シード株をマイクロプレートで 10^{-1} ~ 10^{-8} までに希釈し、6日間培養、そのHA価の推移を測定した。また、保存シードからの直接培養では抗原液量が不十分になるような大量培養も想定して、保存シード株を1日間前培養を行ったものについても同様にマイクロプレートで 10^{-1} ~ 10^{-8} までに希釈し、そのHA価の推移を測定した。

実際のスケールで培養を行うと、マイクロプレート内での培養ほどHA価が上がらない場合があったので、培地のバッファー濃度の検討も行った。

Frey培地中のリン酸緩衝液の100濃度のリン酸緩衝液（1.1M）を作成し、通常のFrey培地に、0%、2%、4%または6%を添加して（最終濃度はそれぞれ0.011M、0.033M、0.055Mおよび0.077M）、50m lのファルコンチューブで培養を行い、24時間から96時間の間、HA価の変化を経時的に測定した。

(2) HI試験術式

基本的には市販のND・HI試験抗原（化血研）と同じ術式で行った。プレートはU字プレ

ートを用い、 $25\mu\text{l}$ で血清を2倍段階希釈、4単位の抗原液 $25\mu\text{l}$ を添加した後に、 $50\mu\text{l}$ の0.5%鶏血球液を添加した。抗原添加後の感作時間については検討を行った。

(3) 抗体検査

平成22年度に行ったひな白痢検査血清300検体（種鶏場3農場いずれもMG生ワクチン使用）について、通常の急速凝集反応とともに本法による検査を行った。そのうち1群100検体については、急速凝集反応の凝集の程度とHI抗体価の相関を調べる目的で、急速凝集反応の凝集の程度をレベルⅠ（2分後にも凝集なし）、レベルⅡ（2分で凝集）、レベルⅢ（1分で凝集）、レベルⅣ（30秒以内に凝集）分け、それぞれのHI価の分布を比較した。

また、比較のため各種飼養形態（コマーシャル採卵鶏・不活化ワクチン接種あり、コマーシャル採卵鶏・ワクチン接種なし、特用採卵鶏・ワクチン接種なし、コマーシャルブロイラー・ワクチン接種なし）の農場から採取した検体についてもHI検査を行った。

3. 結果

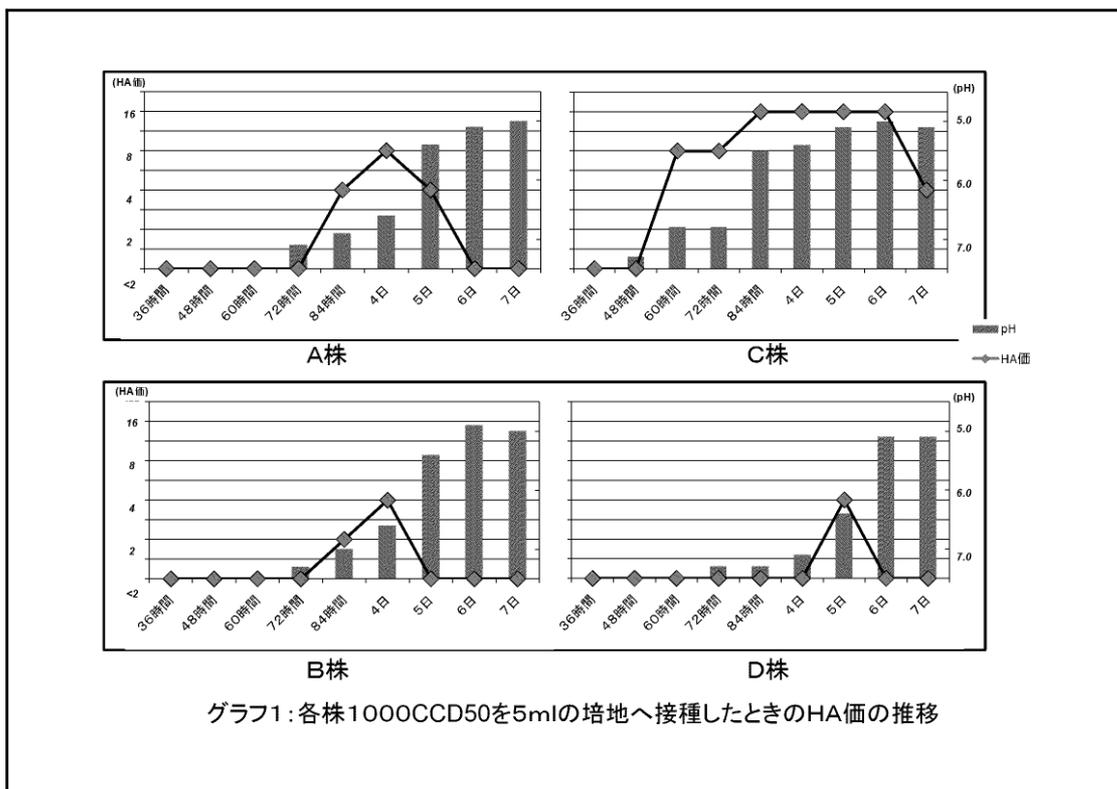
(1) 種株の分離および選定

分離されたマイコプラズマはMG特異プライマーを用いてPCRを行ったところすべてMGと同定された。

農場	検体数	検体の種類	マイコプラズマ分離
採卵鶏	20	正常鶏気管スワブ	1 (C)
採卵鶏(特用)	20	正常鶏気管スワブ	0
ブロイラー	10	正常鶏気管スワブ	0
ブロイラー(特用)	20	正常鶏気管スワブ	3 (A, B, D)

分離された4株のうちHA抗原として最適なものを選定する目的で、各株の1000 CC_{D50}を5mlの培地へ接種してそのHA価を経時的に測定した（グラフ1）ところC株が

HA価の最高値も高く、また高いHA価も持続しているためC株をHI試験のための抗原とすることにした。



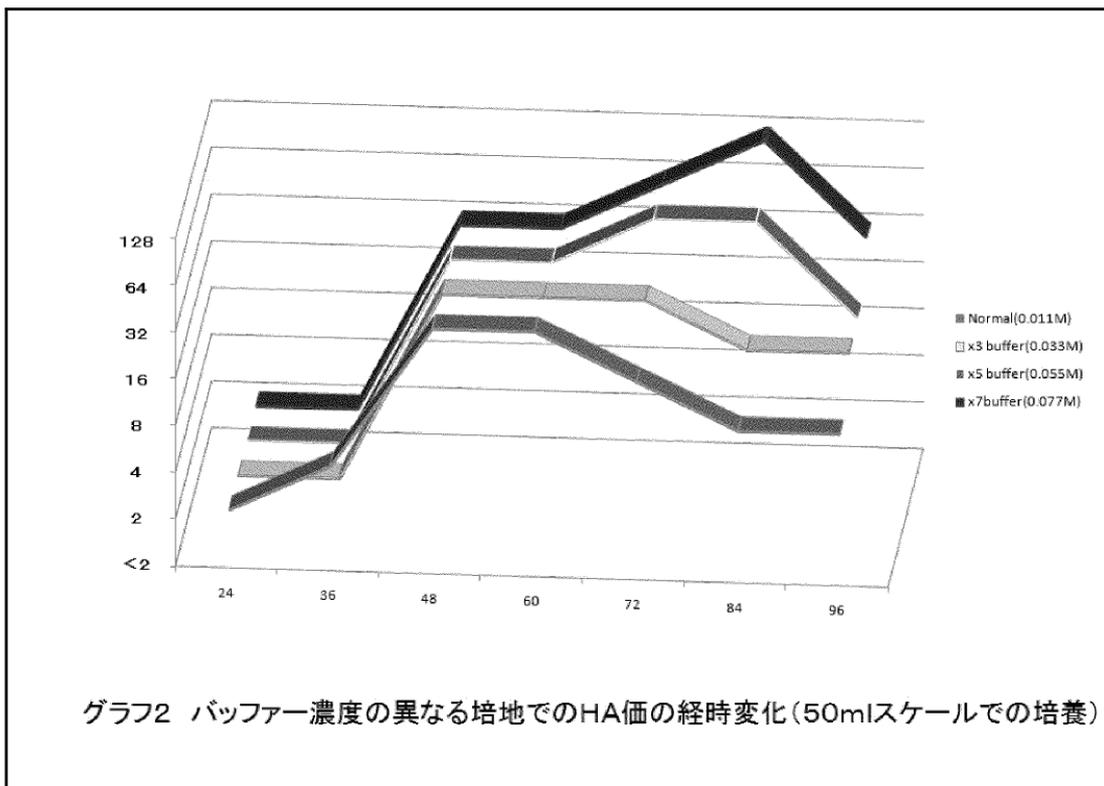
また、マイクロプレートでの経時培養では、保存シードを直接培養した場合も保存シードを一度前培養してから培養した場合も概ね同様の結果であった。保存シードからの直接培養では、 10^{-2} および 10^{-3} の希釈で2日間培養したときと 10^{-4} および 10^{-5} で培養したとき64以上のHA価を示した。前培養からの培養では 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 希釈で2日間培養したとき64以上のHA価を示した（表2）。

保存シードから直接培養 保存シードの力価 $10^{7.875} \text{CCD}_{50}$	希釈	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
	day1	32	8	<2	<2	<2	<2	<2	<2
	day2	32	128	64	32	4	<2	<2	<2
	day3	16	16	16	64	128	16	16	8
	day4	4	4	8	8	16	16	32	32
	day5	4	4	4	4	8	8	8	16
	day6	2	2	4	4	4	4	4	8

1代前培養後培養 前培養の力価 $10^{8.0} \text{CCD}_{50}$	希釈	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8
	day1	32	32	8	<2	<2	<2	<2	<2
	day2	16	64	128	64	32	8	<2	<2
	day3	8	8	16	32	32	32	16	16
	day4	8	8	8	8	16	16	16	32
	day5	<2	4	4	4	8	8	16	16
	day6	<2	<2	<2	<2	4	4	4	8

表2 各希釈での培養時におけるHA価の経時変化(マイクロプレート培養)

異なるバッファー濃度の培地で、実際抗体検査に使用するとき想定されるのスケール(50ml)で培養をするとバッファーを7倍強化した培地で最も高いHA価(128)が得られ、また、高いHA価を示す時間も長かった(グラフ2)。

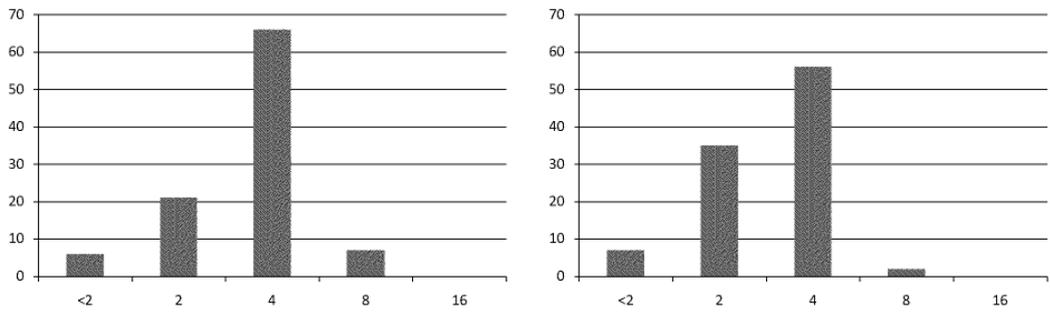


(2) HI試験術式

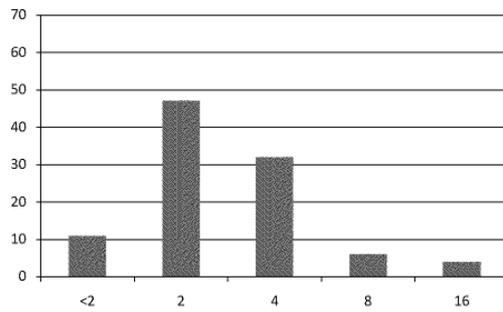
抗原添加後の感作時間については検討を行った。同じ血清について、感作時間を10分、30分、1時間、2時間または5時間感作させHI試験を行った。5時間で凝集阻止が見られた希釈でも、感作時間が1時間までだと完全に凝集が阻止されておらず、反応がプラトーになるには2時間が必要であると考えられた。従って、以降の試験では感作時間を2時間とした。

(3) 抗体検査成績

ひな白痢検査時に検査した種鶏場3農場ではHI抗体価がほとんどが8以下で、16を超えるものはなかった。採血を行った3鶏群をいずれもMGの生ワクチンの接種を受けていた。採卵鶏種鶏農場の方がやや高い抗体価を示す個体が多かった。これらの抗体価はその後の継続検査でもほぼ同程度に推移しており、野外感染による抗体とは考えにくく、生ワクチンの接種を受けた鶏群の抗体価のレベルが最大でも16程度であるものと考えられた(グラフ3)。また、急速凝集反応の凝集の程度ごとのHI価の分布を見たところレベルIVの血清ではHI価も高い傾向があった。(グラフ4)

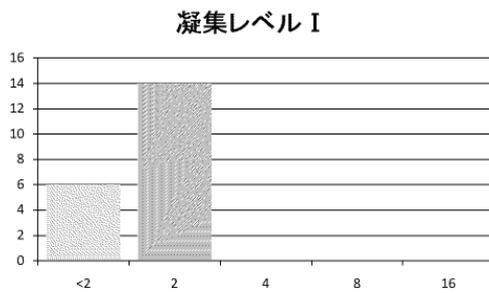


ブロイラー種鶏1 (生ワクチン49日齢、採血143日齢) ブロイラー種鶏2 (生ワクチン35日齢、採血106日齢)

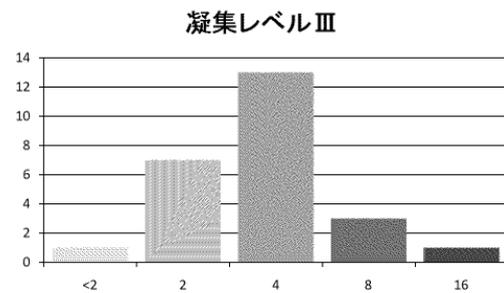


採卵鶏種鶏 (生ワクチン35日齢、採血100日齢)

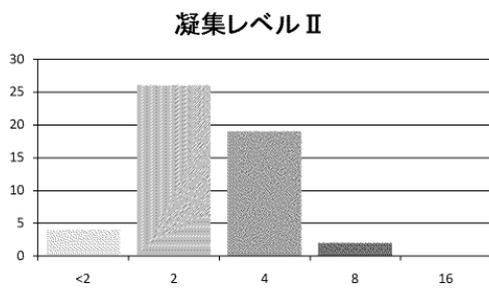
グラフ3 3種鶏群のMG HI抗体価の分布



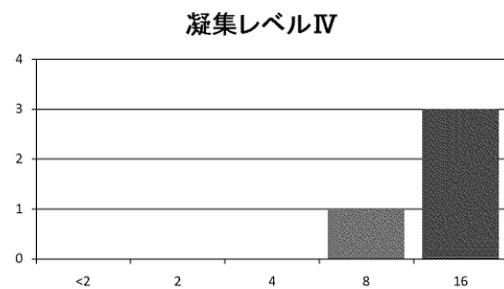
n= 20



n= 25



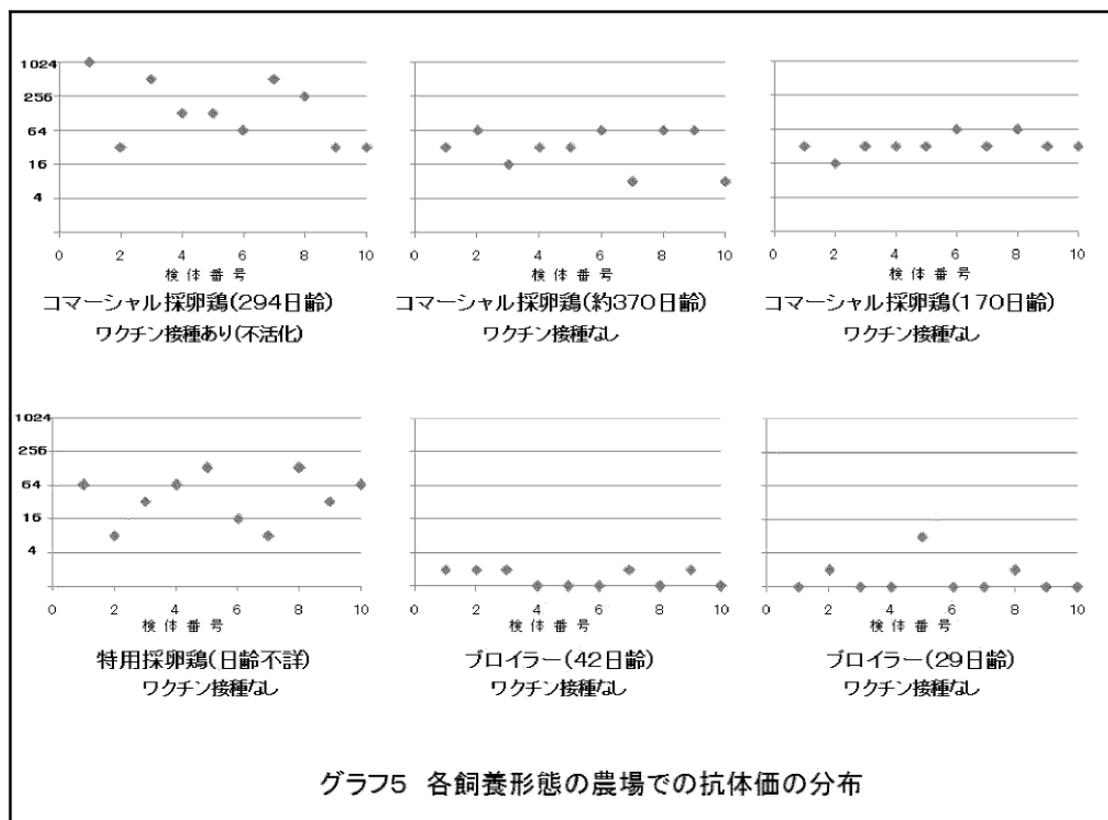
n= 51



n= 4

グラフ4 凝集レベルごとのMG HI抗体価の分布

比較のための検査を行った各飼養形態の農場での抗体価の分布をグラフ5に示す。ワクチンを使用していない農場でも64以上の抗体価も多数見られ、これらは野外感染による抗体と考えられた。不活化ワクチンを使用している農場ではさらに高い抗体価のものが多く見られた。



4. まとめ

MG生ワクチンの接種を受けた種鶏のMG急速凝集反応はほとんどの検体で微妙な程度の凝集が見られ、その判定は非常に困難となる。今回我々が行ったHI試験では、生ワクチンで得られるHI価は最大16程度と考えられ、これを基準に明瞭に野外感染の有無が判断できると期待できる。今回使用したMG株は高いHA価があり、希釈した抗原液を用いてHI試験ができるので安価に検査を行うことができた。また、ひな白痢検査時にMG急速凝集反応で強い陽性をしめす検体は、HI価も高い可能性が高いので、少なくともそのような検体についてはHI試験で確認して、再検査の可否を判断する必要があると思われた。