ブタの初乳による抗体スクリーニング検査法の検討

小川秀治 伊藤 隆 佐藤 行 鎌田久祥 安田 有 渡部 満

秋田県南部家畜保健衛生所

Antibody Screening by the Use of Sow Colostrum

S. Ogawa, R. Itoh, A. Satoh, H. Kamada, Y. Yasuda and M. Watanabe

Akita Prefecture Southern Region Livestock Hygiene Service Center

要 約 分娩後における乳清及び血清中免疫グロブリンG (IgG) 濃度、豚萎縮性鼻炎 (AR)、豚丹毒 (SE) 凝集抗体価の経時的推移を、母豚24頭を用いて調査した。乳清中IgGは、分娩0日が最も高く、42.5mg/mlと血清IgGの約3倍の値を示した。この後16日までは血清と同レベルで推移し、以降低下し20日で血清の半分になった。乳清中のAR抗体およびSE抗体は、それぞれ分娩後20日、分娩後10日まで検出可能であった。豚オーエスキュー病ラテックス凝集抗体を、ワクチン接種豚の乳清38検体、未接種豚の乳清23検体を用いて調査した。ワクチン接種豚の乳清中抗体は分娩0日の9検体全てが陽性を示し、10日後の2検体も陽性を示した。酵素抗体法 (ELISA) 検査では、凝集抗体陽性の検体は全例ワクチン抗体と判断された。未接種豚の乳清23検体は全て抗体陰性であった。なお、野外抗体陽性6例の検査では、乳清中の抗体は血清と同じく野外抗体と判断された。

初乳は血清と同様の抗体検査が可能であり、初乳を用いた抗体検査は繁殖母豚群の抗体スクリーニングや疾病清浄化に向けて有効な方法と考えられた。

——キーワード：豚、初乳、乳清、抗体検査、オーエスキュー病

家畜臨床誌 29(1):1-5, 2006

ABSTRACT Postpartum changes in the immunoglobulin G (IgG) concentration and the agglutination antibody titers of swine atrophic rhinitis (AR) and swine erysipelas (SE) in whey and serum were studied in 24 sows. The whey IgG was highest (42.5mg/ml) immediately after farrowing (Day 0), when its concentration was 3 times that in the serum. The IgG concentration decreased to the same level as that of the serum by Day 16 and to half the serum concentration by Day 20. AR antibody and SE antibody could be detected in the whey, respectively, until Day 20 and Day 10. The latex agglutination antibody of Aujeszky's disease was studied in 38 whey samples collected from vaccinated sows and 23 samples from unvaccinated sows. Nine out of 9 samples on Day 0 from vaccinated sows were antibody positive and 2/2 samples on Day 10 were positive. ELISA confirmed that all the latex agglutination antibodies detected in the samples were vaccine antibodies. Antibody was not detected in 23 whey samples collected from unvaccinated sows. Examination of 6 antibody-positive cases observed in the field showed that the antibodies both in the whey and the serum had been induced by field infection. It was possible to detect antibodies effectively with colostrum, as with serum, and it appeared that colostrum antibody testing could become an effective means for the antibody screening of breeding sows and for maintaining them disease-free.

——Key Words : swine, colostrum, whey, antibody, Aujeszky's disease

Jpn. J. Vet. Clinics 29(1):1-5, 2006

Received 5 October 2005 / Accepted 31 January 2006

*Correspondence to S. Ogawa, Akita Prefecture Southern Region Livestock Hygiene Service Center, 6-55 Fujimicho, Daisen, 014-0011, Japan (〒014-0011 大仙市富士見町6-55)

緒 言

母豚の抗体スクリーニングは農場の疾病対策に有効であるが、そのための採血は豚へのストレスや事故などの懸念から農家が難色を示すことがある。また、農場への立入制限、採血の時期などの制約があり、血液による抗体検査は容易ではない。

初乳中には血清と同等以上の免疫グロブリンが存在していることが知られている [11]。今回我々は初乳中の免疫グロブリンに着目し、乳汁を検体とした抗体検査の可能性について検討を行った。検討項目は、乳汁処理方法、分娩後の乳清と血清における免疫グロブリンG (IgG) 濃度、豚萎縮性鼻炎 (AR) 及び豚丹毒 (SE) 凝集抗体価の経時的变化の比較、乳清による豚オーエスキー病 (AD) 抗体の検出、酵素抗体法 (ELISA) による乳清中の豚繁殖・呼吸器障害症候群 (PRRS) 抗体検出、の4項目である。

材料および方法

1) 材料

12戸の養豚農家から母豚の乳汁と血液を採材した。検査材料として、母豚48頭から採取した分娩0日から分娩後20日までの乳汁61検体と母豚24頭の分娩0日から分娩後20日までの血液29検体を供試した。また、AD野外抗体陽性の母豚から採取した血液および乳汁6検体についてAD抗体検出を試みた。血液は20℃、2,500回転/分で10分間遠心することにより血清を回収し、抗体検査に供した。

検体採取農家における母豚へのワクチン接種状況はARが10戸で分娩前4週と2週に、SEが12戸で年2回、ADが11戸で年2回実施していた。

2) 乳汁処理方法

乳汁中の免疫グロブリンは、乳汁から脂肪とカゼイン

を除去した乳清中のタンパク質に含まれる [13]。そこで、検体は脱脂のみを行った乳清で良いのか、肉眼的に透明な乳清まで処理する必要があるかについて検討した。

乳汁から脱脂乳を採取するため、4℃、12,000回転/分で30分遠心した。さらに、脱脂乳から透明な乳清を得るため、カゼイン除去を実施した。カゼイン除去は、凝乳酵素レンネットによるカゼイン凝固法 (レンネット処理) と5N塩酸添加による酸処理法によって実施した。レンネット処理は、脱脂乳にレンネットを加えて濃度2.86、9.52ng/mlの2濃度に調整し、35℃の恒温槽で、30分反応後、4℃、12,000回転/分で30分間遠心することにより、乳清を回収した。塩酸処理は乳汁にpH4.0～4.5になるように塩酸を添加後、4℃、12,000回転/分で30分間遠心することにより乳清を回収した。使用乳汁は、分娩0日に得た初乳2検体 (AおよびB) を使用した。

3) 抗体検査方法

IgG濃度は、ブタIgGプレート (細菌化学研究所, 仙台) を用いて、一元放射免疫拡散法により行った。ARの凝集抗体価、SEの凝集抗体価はそれぞれAR抗原「北研」 (北里研究所, 埼玉)、日生研アグテックSE抗原 (日生研, 東京) を用いて測定した。ADのラテックス凝集抗体は、AD抗原ラテックス「ゼンノウ」 (バイラルアンチゲン社, 米国) を用いて、検査した。ADおよびPRRSのELISA検査は、それぞれADV (gI) エリーザキット (アイデックスラバトリーズ, 米国)、PRRSエリーザキット (アイデックスラバトリーズ, 米国) を用いた。

結 果

1) 乳汁処理方法

豚の乳汁処理結果を表1に示した。レンネット処理では透明な乳清が濃度9.52ng/mlのみで得られた。塩酸処

表1 乳汁処理結果

処理方法	濃度・乳汁 pH	供試 材料	乳精 透明度	* ¹ IgG濃度 (mg/ml)	* ² AR抗体価	* ³ SE抗体価
レンネット	2.86	A	混濁	29.61	1280	32
	ng/ml	B	混濁	42.00	2560	32
	9.52	A	透明	29.61	1280	32
	ng/ml	B	透明	40.74	2560	64
塩 酸	ph 4.5	A	混濁	24.36	1280	32
		B	混濁	25.70	2560	64
	ph 4.0	A	凝固	—	—	—
		B	凝固	—	—	—
脱 脂		A	混濁	25.20	1280	64
		B	混濁	39.06	2560	64

*¹IgG: 免疫グロブリンG, *²AR: 豚萎縮性鼻炎, *³SE: 豚丹毒

理では、脱脂乳800 μ lに5N塩酸10 μ lを添加することでカゼインが凝固するpH4.5が得られたが、透明な乳清は回収できなかった。そこで、添加量を20 μ lとしたところ乳汁全体が凝固し、乳清は得られなかった。

IgG濃度はレンネット処理に比べ、塩酸処理で低下する傾向がみられた。抗体価ではAR、SEとも処理方法による大きな変化はみられなかった。

2) 乳清と血清におけるIgG濃度、AR、SE凝集抗体価の分娩後経時的变化の比較

乳汁処理方法を比較した結果、最も簡易な脱脂処理でも抗体検査が実施可能であることが示唆された。そこで、脱脂のみを行った乳清中IgG濃度の分娩後の経時的变化を測定した。分娩0日の乳清IgGは42.5mg/mlで、分娩0日の血清IgGの約3倍の高い値を示した。以後、減少し6日以降では血清と同等濃度で推移、17日以降は血清より低値、20日では血清の約半分となった(図1)。

乳清中AR抗体価にばらつきはみられるが、分娩後10日までは血清AR抗体価より高値を示し、11日以降16日まで血清と同等濃度で推移し、17日以降は血清より低値となった(図2)。

乳清中SE抗体価は分娩0日で血清SE抗体価より高値を示した。その後減少し、分娩11日以降抗体は検出されなかった(図3)。

図1. 分娩後の免疫グロブリン濃度の変化

3) 乳清によるADラテックス凝集抗体の検出

ADワクチン接種の母豚38頭、未接種の母豚23頭から得られた乳清および血清についてラテックス凝集抗体検査とELISA検査を実施した。また、AD野外株陽性豚6頭から得られた乳清および血清について、同じ検査を行った。

①ADワクチン接種豚の検査

ラテックス凝集抗体検査では分娩0日の乳清は9頭全て陽性であった。これ以降、分娩後11日まで凝集がみられ、19日では凝集陰性であった。ELISA検査では分娩0日から19日までの乳清全てに、ワクチン抗体が検出された。なお、血清では全ての個体にワクチン抗体が検出された(表2)。

図2. 分娩後の豚萎縮性鼻炎抗体価の変化

図3. 分娩後の豚丹毒抗体価の変化

表2 AD検査結果

分娩後日数	ラテックス凝集抗体		ELISA (* ² gI ⁻)	
	陽性検体/検査検体		陽性検体/検査検体	
	乳汁	血清	乳汁	血清
0	25/25	9/9	25/25	9/9
1	5/5		5/5	
2	4/4		4/4	
9		1/1		1/1
10	2/2	2/2	2/2	2/2
11	1/1	1/1	1/1	1/1
19	0/1		1/1	
29		1/1		1/1
* ¹ 未接種豚	0/23	0/15		

*¹未接種豚の分娩後日数：0日～20日

*²gI⁻：豚オーエスキー病gI⁻抗体

②ADワクチン未接種豚の検査

ラテックス凝集抗体検査で乳清、血清ともに抗体は検出されなかった（表2）。

③AD野外株陽性豚の検査

全例において乳清、血清ともラテックス凝集反応陽性で、ELISA検査によって野外株陽性と判断された。

4) 乳清によるPRRS抗体の検出

PRRS抗体検査は同一個体の乳汁22検体と血清22検体についてELISA検査を実施した。抗体陽性は8頭、陰性は14頭で、同一個体から採取した血清と乳清の抗体検査結果は、陽性、陰性共にすべて一致した。

考 察

今回、初乳に含まれる免疫グロブリンに着目し、乳汁による抗体検査の可能性を検討した。

豚の乳汁を脱脂のみの処理を行った検体、酵素あるいは酸処理によって透明な乳清を得た検体について、IgG濃度及び抗体価を比較したが大きな差はみられなかった。実際の乳汁処理作業は、行程の少ない脱脂のみによる前処置が適していると考えられた。

分娩後のIgG濃度および抗体の経時的変化を調査したところ、分娩0日の乳清IgG濃度は血清の約3倍で分娩後16日まで血清と同等、20日で血清の約半分であった。分娩0日でのIgG濃度に多少の差はみられたが、斎藤ら[10]、室伏ら[5]の報告と同様の動態が確認された。抗体価については、ARとSEについて調査を行った。乳清抗体価は分娩0日でそれぞれの血清抗体価に比較して著しい高値を示し、分娩後日数の経過とともに減少した。概ね分娩後10日までの乳汁で、AR、SEの抗体検査は可能と考えられた。

ADワクチン接種豚の抗体検査では、分娩後11日まで凝集抗体陽性を示した。しかし、分娩後19日で凝集抗体は検出されなかった。同一検体のELISA検査で、検査を実施した乳清全例にワクチン抗体が検出された。これらの所見は血清を用いた抗体検査と同一の結果であった。また、ワクチン未接種豚のAD検査により、血清抗体陰性の豚には乳汁中抗体が検出されないことが確かめられた。乳汁によるAD検査は分娩0日であれば全例で抗体が検出され、少なくとも分娩後10日までの乳汁で検査可能と考えられた。なお、AD血清抗体と乳清抗体の一致はワクチンによるもの、野外株による抗体を問わず同一の結果であった。加藤[1]は濾紙に吸着した初乳の抽出液を用いてADのELISA検査を実施し、初乳を用いたAD検査の有用性を報告している。今回我々の用いた検

体は、乳汁を脱脂処理したのみの乳清である。加藤[1]の処理に比較して検体を得るための前処置は簡易であり、当初懸念されたラテックス凝集反応の見づらはさは感じられなかった。

PRRS検査で陽性豚8頭、陰性豚14頭で、同一個体から採取した血清と乳清の抗体検査結果は、陽性、陰性共に全て一致した。乳清でのPRRS抗体の検出は可能であり、母豚の疾病スクリーニングとして乳汁を用いることは有用であると考えられた。

乳汁を用いての抗体スクリーニング検査は、乳清中のIgG濃度、抗体価の分娩後の推移を検討した結果、乳汁を用いての抗体検査は分娩0日の乳汁、すなわち初乳を検体とするのが精度のうえで最も確実であると考えられた。また、採材にあたって分娩0日の採材が最も容易であった。この時期の母豚は十分量の移行抗体を子豚に与えるため産乳量が豊富で、ほとんど起立しないため採材に要する時間は短く、母豚に対するストレスは極めて少ないものと考えられた。初乳を使用した抗体検査は、疾病スクリーニングなどを目的に *Actinobacillus pleuropneumoniae* [2,6]、*Mycoplasma hyopneumoniae* [3,7-9,12]、*Pauteurella multocida* [4] などについての報告が見られる。フィンランドではFinnish Pig-health Schemeによって初乳を農家が採材し、それぞれの疾病の疫学調査や根絶計画の策定に用いられている[2-4,8,9]。フィンランドでの一連の報告のなかでLevonen[3]は *Mycoplasma hyopneumoniae* について185戸6,256例の初乳サンプルを調査した結果、初乳中の抗体は臨床症状発現の6か月前に検出可能で、臨床症状発現時の血清抗体陽性率は10.9%に止まっていたとし、初乳を用いた抗体検査の優位性について強調している。我々の調査では分娩後経過について詳細な時間は記録していないが、Rautiainenら[8]は分娩2時間以内の初乳中抗体はその後に採材したそれに比べ3倍高いと報告している。

以上のことから、初乳による抗体検査は血清と同様の検査が可能で、採材も容易であることから母豚へのストレスも少なく、農家の理解を得やすいと考えられた。さらに、農家自身が採材可能で保存も容易である。乳汁による抗体検査は、疾病スクリーニングや疾病清浄化に向けて有効な方法のひとつであり、各種疾病の浸潤調査や対策に有効的に活用を図りたい。

文 献

- 1 加藤多喜雄 (1986). 初乳吸着濾紙を検査材料としたELISAによるオーエスキー病の抗体検査. 日本の養豚 35: 40-45.
- 2 Levonen, K., Veijalainen, P. and Seppanen, J. (1994). *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype-2 antibodies in sow colostrum in Finnish pig-health-scheme herds. Zentralbl Veterinarmed B 41: 567-573.
- 3 Levonen, K. (1994). Detection of enzootic pneumonia in pig herds using enzyme-linked immunosorbent assay in sow colostrum. Res. Vet. Sci. 56: 11-113.
- 4 Levonen, K., Frandsen, P. L. and Seppanen, J. (1996). Detection of toxigenic *Pasteurella multocida* infections in swine herds by assaying antibodies in sow colostrum. J. Vet. Diagn. Invest. 8: 455-459.
- 5 室伏淳一, 松本浩二, 河原崎達雄 (1999). SPF豚におけるIgG値の推移. 静岡中小試研報 10: 19-22.
- 6 Nielsen, R. (1995). Detection of antibodies against *Actinobacillus pleuropneumoniae*, serotype 2 in porcine colostrum using a blocking enzyme-linked immunosorbent assay specific for serotype 2. Vet. Microbiol. 43: 277-281.
- 7 Rautiainen, E. (1998). The prevalence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds in western Finland based on the demonstration of antibodies in colostrum by ELISA. Acta Vet. Scand. 39: 325-330.
- 8 Rautiainen, E., Tuovinen, V. and Levonen, K. (2000). Monitoring antibodies to *Mycoplasma hyopneumoniae* in sow colostrum - a tool to document freedom of infection. Acta Vet. Scand. 41: 213-225.
- 9 Rautiainen, E., Oravainen, J. and Virolainen, J. V. (2001). Regional eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* from pig herds and documentation of freedom of the disease. Acta Vet. Scand. 42: 335-364.
- 10 斎藤至是, 真田 武, 岩崎 孝 (1986). 母豚乳汁および哺乳子豚血清のIgG, IgM, IgAの動態について. 日畜会報 57: 349-351.
- 11 清水悠紀臣 (1981). 感染症と母子免疫: 獣医領域における免疫学. 第1版. 553-563, 近代出版, 東京.
- 12 Wallgren, P., Bolske, G. and Gustafsson, S. (1998). Humoral immune responses to *Mycoplasma hyopneumoniae* in sows and offspring following an outbreak of mycoplasmosis. Vet. Microbiol. 60: 193-205.
- 13 山本邦男 (1978). 牛乳: 畜産大事典. 第4版. 945-957, 養賢堂, 東京.