子馬の自然発生 *Rhodococcus equi* 感染症診断への 酵素免疫吸着測定の実用

真田靖幸 野田 寛 永幡 肇

酪農学園大学酪農学部（江別市文京台緑町 〒069）

（平成4年2月24日受付・平成4年8月21日受理）

Application of Enzyme-Linked Immunosorbent Assay to Diagnosis
of Naturally Occurring *Rhodococcus equi* Infection in Foals
YASUYUKI SANADA, HIROSHI NODA, HAJIME NAGAHATA
Rakuno Gakuen University, Ebetsu-shi, Hokkaido 069

SUMMARY

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to an early diagnosis of naturally occurring *Rhodococcus equi* (*R. equi*) infection in foals. Of 247 sera from foals with suspected acute bacterial infection, 149 (60.3%) were positive for antibody to *R. equi*. The antibody-positive rates of foals with pneumonia, enteritis, and arthritis were 77.5%, 53.2%, and 30.6%, respectively. All sera from 4 foals with both pneumonia and enteritis were positive for antibody. No statistical difference was found among the sexes or breeds on an antibody-positive rate. A comparison was made between ELISA and Agar-gel immunodiffusion (AGID) using serum samples from 60 foals with suspected acute inflammation. The ELISA OD values of individual foal sera showed a significant correlation ($r = 0.86$, $p < 0.01$) with their AGID titers.

—Key Words : diagnosis, ELISA, foal, *Rhodococcus equi*.

-----J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 45, 915~918 (1992)

要 約

子馬の *Rhodococcus equi* (*R. equi*) 自然感染に対する早期診断を確立するため ELISA 法を応用することを検討した。急性細菌感染が疑われた 247 頭中 149 頭 (60.3%) の血清は、*R. equi* に対して抗体陽性反応を示した。肺炎、腸炎および関節炎を呈した子馬の抗体陽性率はそれぞれ 77.5%、53.2% および 30.6% であった。肺炎と腸炎の複合型を呈していた 4 頭の子馬血清はすべて抗体陽性反応を示した。性別および品種間で抗体陽性率に有意な差は認められなかった。急性炎症が疑われた 60 頭の子馬血清を用いて ELISA 法と AGID 法の比較を行った。各子馬血清の ELISA OD 値は、AGID 反応強度と有意な相関性 ($r = 0.86$, $p < 0.01$) が認められた。

このことから、野外における *R. equi* 感染症の診断として ELISA 法は AGID 法よりも有用な方法であることが確認された。——キーワード：診断, ELISA, 子馬, *Rhodococcus equi*.

-----日獣会誌 45, 915~918 (1992)

子馬の *Rhodococcus equi* (*R. equi*) 感染症は化膿性気管支肺炎および腸間膜リンパ節炎を伴う潰瘍性腸炎を主徴とする重篤で死亡率の高い疾病である¹⁾。良好な予後をもたらすには早期診断による早期治療が不可欠であるため^{7, 19)}、本症を早期に的確に診断し得る方法として血清学的診断法の確立が必要とされている^{12, 19)}。これまで凝集反応¹⁰⁾、間接血球凝集反応³⁾および補体結合反応²⁾が試みられたが、いずれの方法も抗体検出が非常に困難であるため、本症の免疫の主体は体液性免疫より細胞性免疫であろうと考えられてきた^{1, 4, 5, 14)}。WILSON²⁰⁾は菌培養上清を抗原として用いた皮膚の遅延型過敏反応で、また、免疫学的生体反応評価法として、PRESCOTT ら¹⁵⁾

は *R. equi* 菌体を抗原としたリンパ球幼若化反応で細胞性免疫能の評価を試みた。その結果、リンパ球幼若化試験は有用性が認められたが、生後2カ月以内の子馬でのみ応用可能なこと、試験手技が複雑であること、判定に数日を要することなどから日常診断では応用上やや問題があった。1980年、NAKAZAWA¹¹⁾は本症の子馬の血清中に沈降抗体が存在することを明らかにし、寒天ゲル内拡散 (Agar gel immunodiffusion; AGID) 法が本症診断に有用であることを報告した。近年、より鋭敏に *R. equi* 抗体を検出し得る方法として、酵素免疫吸着測定 (Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA) 法が応用されてきている^{6, 8, 19)}。しかしながら、本症の自然

感染例に対する ELISA 法を用いた抗体検出の検討はまだ不十分であり、また、本症の発生状況を把握する意味で新生子期における子馬の病型と *R. equi* 抗体陽性率との関連を調査することは極めて重要であると考えられる。今回、著者らは *R. equi* 自然感染子馬の早期診断を ELISA 法で行うため、野外発症例へ応用するとともに AGID 法との抗体検出感度の比較検討を行った。

材料および方法

供 試 血 清

1989 年 2～8 月の期間に、北海道日高地区農業共済組合家畜診療センターに血液検査の依頼があった患畜のうち、発熱、肺炎、腸炎および関節炎などの臨床症状を示したのから初診時に血清を採取した。これらの野外発症例は一般血液検査で総白血球数 $15,000/\text{mm}^3$ 以上、好中球/リンパ球比 3.0 以上、フィブリノーゲン 0.9g/dl 以上および α -グロブリン 20% 以上の 4 項目中 2 項目以上が該当し、急性感染症が疑われた日高地方 8 地区 169 牧場で飼養されていた 1～157 日齢の軽種馬 247 頭（サラブレッド種 206 頭、アングロアラブ種 41 頭）であった（表 1）。ELISA 法と AGID 法との抗体検出感度の比較検討には、これらのうち ELISA 法の反応を中心に抗体価が広く均等に分布するように供試馬を選定し、9～157 日齢の 60 頭の血清を用いた。

A G I D 法

抗 原：北海道日高家畜保健衛生所から分与を受けた中沢宗生先生（家畜衛生試験場九州支場）の作製による AGID 用 *R. equi* 抗原液¹¹⁾を用いた。

術 式：ノーブルアガー（Difco Laboratories, USA）に生理食塩液を加え、加温溶解し、1%寒天液を作製した。スライドガラス（ $26 \times 76\text{mm}$ ）上に寒天液 4.5ml を重層し、室温下で硬化させた。寒天スライドの小穴（ウェル）の直径は 4mm 、ウェル間隔は 3mm とし、中央のウェル内に抗原液、周囲のウェル内に陽性血清および被検血清をいれた。湿潤容器内で室温下 48 時間反応させ、沈降線の出現状態を観察した。判定は AGID 反応における判定基準（図 1）に準じて行った。

表 1 日高地方の急性感染症の子馬の病型別 *Rhodococcus equi* 抗体陽性率

病 型	供試頭数	陽性頭数	陽性率(%)
発 熱 の み	16	9	56.3
肺 炎	120	93	77.5
腸 炎	47	25	53.2
関 節 炎	49	15	30.6
肺炎 + 腸炎	4	4	100.0
肺炎 + 関節炎	1	0	0.0
そ の 他	10	3	30.0
計	247	149	60.3

ELISA 法

ELISA 法は TAKAI ら¹⁹⁾の方法に準じて行った。

抗 原：*R. equi* ATCC 6939 株をトリプトソーヤ寒天培地（日水製薬）に接種し、 37°C で 48 時間培養した。湿菌 2g を 10ml の 0.1% Tween 20 加リン酸緩衝液（ $\text{pH}7.4$ ）中に浮遊させ、恒温浴槽内で 37°C 、90 分間保温した。保温後、 $20,000\text{G}$ で 4°C 、30 分間遠心し、上清を $0.45\mu\text{m}$ のフィルターで濾過して抗原液とした。抗原液は供試時まで -20°C で保存した。実験に際し、抗原濃度が $5\mu\text{g/ml}$ となるように 0.05M 炭酸緩衝液で調整して用いた。抗原蛋白量の定量は Bio-Rad Protein Assay（Bio-Rad Laboratories, USA）で行った。

対 照 血 清：陽性対照として、北里大学獣医畜産学部から分与された血清¹⁹⁾を用いた。陰性対照として、3 頭の新生子馬の臍帯血から得られたブルー血清を用いた。

2 次 血 清：抗馬 IgG-HRP 酵素ラベル血清（Cappel, USA）を 10% ブロックエース液（雪印乳業）で 4,000 倍に希釈して用いた。

術 式：抗原液を 96 穴 ELISA プレート（Corning USA）の各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ分注し、 4°C で 16 時間以上静置して抗原の固相化を行った。0.02% Tween 20 加生理食塩液にてプレートを 3 回洗浄後、10% ブロックエース液にて 100 倍希釈した被検血清を各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ加え、 37°C で 1 時間反応させた。プレート洗浄後、2 次血清を各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ加え、 25°C で 30 分間反応させた。プレート洗浄後、基質液（O-フェニレンジアミン）を各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ加え 25°C で 20 分間反応させた。3N 硫酸を各ウェルに $100\mu\text{l}$ ずつ加え反応を停止させた。イムノリーダー（Inter-Med, JAPA）を用いて 492nm で各ウェルの吸光度（OD 値）を測定した。各検体の OD 値は 2 つのウェルの測定値の平均値で表した。*R. equi* 抗体陽性値は著者らの前報告に従って ELISA OD 値 0.3 以上とした¹⁶⁾。

成 績

急性感染症が疑われた子馬の *R. equi* 抗体陽性率
臨床症状および血液検査により急性感染症が疑われた

図 1 AGID 反応における判定基準

図2 ELISA法とAGID法との抗体検出感度の相関性

軽種当歳馬 247 頭の病型と *R. equi* 抗体陽性率を表 1 に示した。247 頭中 149 頭 (60.3%) が抗体陽性を示した。肺炎症状を呈した 120 頭の子馬のうち 93 頭が抗体陽性で、陽性率は 77.5% であった。また、関節炎 49 頭中 15 頭、腸炎 47 頭中 25 頭、発熱のみ 16 頭中 9 頭が抗体陽性で、陽性率はそれぞれ 30.6%, 53.2%, 56.3% であった。肺炎と腸炎の両方の症状を呈していた 4 頭では抗体陽性率は 100% であった。さらに性別および品種別に抗体陽性率を比較したところ、雄と雌ではそれぞれ 64.9% と 54.9%, サラブレッド種とアングロアラブ種ではそれぞれ 60.7% と 58.5% であり有意な差は認められなかった。

ELISA と AGID との比較

臨床症状および血液検査により急性感染症が疑われた軽種当歳馬 60 頭の血清を用いて行った ELISA と AGID との相関関係を図 2 に示した。AGID の反応強度が -, +, ++, Ⅲ, Ⅳ の時、ELISA OD 値はそれぞれ 0.31 ± 0.20 , 0.57 ± 0.18 , 0.80 ± 0.32 , 1.16 ± 0.21 , 1.31 ± 0.41 であり、両者間には高い正の相関 ($r=0.86$, $p<0.01$) が認められた。AGID で抗体陽性を示した 40 頭は ELISA でも全頭陽性を示したが、AGID で抗体陰性を示した 20 頭のうち ELISA でも陰性を示したのは 10 頭であり、10 頭は陽性を示した。

考 察

わが国の馬の生産地の一部では子馬の *R. equi* 感染症の血清学的診断法として AGID 法が従来より試験的に応用されているが²¹⁾、早期診断という点では感度が低いことからやや問題がある。そこで早期診断法としての ELISA 法の有用性を検討するため、臨床および血液学的に急性感染症が疑われた 60 頭の当歳子馬を用いて AGID 法との比較検討を行った。ELISA 法と AGID 法との反応性を比較した報告^{8,19)}は少数ながらみられるが、それらの報告は単に両測定法間で同一子馬群での抗体陽性率を比較しただけのものである。本実験では、

ELISA OD 値と AGID 反応強度との散布図から相関性を検討した。ELISA OD 値と AGID 反応強度との間には高い正の相関性 ($r=0.87$, $p<0.01$) が認められた。また、AGID 法により抗体陽性を示した 40 頭は ELISA 法でも全頭陽性であったが、AGID 法により抗体陰性を示した 20 頭のうち 10 頭が ELISA 法では陽性であった。これらの結果から、ELISA 法は AGID 法より鋭敏に *R. equi* 抗体を検出できる測定法であることが確認された。なお、今回使用した ELISA および AGID 用抗原は異なる菌株を用いて作製されているが、両反応用抗原は他の血清型や菌株との間に広い共通抗原性を有することが既に報告されており¹⁹⁾、さらに今回両反応における測定値には高い正の相関性が認められたことから、*R. equi* 感染症の診断において菌株間の差異を考慮しないで使用可能と考えられる。

ELISA 法による *R. equi* 抗体の検出法を自然感染子馬の診断に応用し、臨床症状および血液検査により急性感染症が疑われた当歳子馬 247 頭について、病型ごとの抗体陽性率を比較したところ、*R. equi* 抗体は肺炎を呈した群で 77.5% と高い陽性率を示した。これらの病型による陽性率は、北海道日高地方で AGID 法を用いて行った *R. equi* 抗体調査の報告²¹⁾とほぼ同様であった。このことから、少なくともこれら肺炎症状を呈する子馬の大部分では発症原因として *R. equi* 感染症が強く示唆された。本症の病型は肺炎、腸炎、関節炎など多岐にわたってみられるが、世界的にみても肺炎型を呈するとの報告が最も多い^{1,22)}。今回の急性感染症の子馬における *R. equi* 抗体の陽性率は、これらの報告を血清学的にも裏付けるものと考えられる。いっぽう、*R. equi* 感染症は品種あるいは性によって感受性に差があることが知られている⁷⁾。本結果では、品種別および性別での陽性率間に有意な差は認められなかった。米国では特にアラブ種の子馬が本菌に対する感受性が高いとの報告があるが⁷⁾、この品種は子馬の 2~3% に先天的な複合免疫不全がみられるとのことから¹⁸⁾、これが原因であると考えられている。

本症の発症は若齢の子馬に多く、本菌に対する感受性が高いと考えられている。本症の発症時期は通常 5~7 月で 10~90 日齢の子馬に多く認められる²⁰⁾。今回の結果から推察すると、子馬における本症の発症時期は約 85% が 5~7 月と考えられ、日齢は 30~110 日で既報告の知見^{1,9,13,17,21)}と類似していた。しかしながら、今回の調査は初診時のみの子馬血清を用いて行ったものであり、他の原因による発病も考慮する必要がある。正確に *R. equi* 感染症の発症を診断するには抗体の陽転時期を知る必要があり、組血清による血清学的診断が必要である。また、Hietala ら⁸⁾は *R. equi* 抗体は母から子に初乳を介して移行することを実証している。したがって若齢の

子馬における *R. equi* 抗体価の評価は、移行抗体の影響も加味し、2回以上の抗体価測定を行うことが望ましいと考えられる。以上の結果より、野外における *R. equi* 感染症の診断として、ELISA 法は AGID 法よりも有用な方法であることが確認された。また、北海道日高地方における子馬の急性感染症の各病型と *R. equi* 感染症との結びつきが示唆され、感染状況が把握された。結果として、急性感染症が疑われた子馬の 60.3% が本症である可能性が示唆された。

稿を終えるにあたり、*R. equi* 菌および陽性対照血清を分与していただいた北里大学獣医畜産学部獣医衛生学教室高井伸二先生に深謝いたします。AGID 用 *R. equi* 抗原を分与していただいた家畜衛生試験場九州支場の中沢宗生および日高家畜保健衛生所の諸先生に謝意を表します。また血清材料の採取にご協力いただいた胆振家畜保健衛生所、日高地区農業共済組合家畜診療センターの諸先生ならびに三石郡三石町開業の真田良典先生、塚田努先生に深謝いたします。

引用文献

- 1) BARTON M D, HUGHES K L: Vet Bull, 50, 65~80 (1980)
- 2) BRUNER D W, DIMOCK W W, EDWARDS P R: J Infect Dis, 65, 92~96 (1939)
- 3) CARTER G R, HYLTON G A: Am J Vet Res, 35, 1393~1395 (1974)
- 4) CIMPRICH R E, ROONEY J R: Vet Pathol, 14, 95~102 (1977)
- 5) ELISSALDE G S, RENSHAW H W: Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 3, 433~445 (1980)
- 6) ELLENBERGER M A, KAEBERLE M L, ROTH J A: Am J Vet Res, 45, 2428~2430 (1984)
- 7) FALCON J, SMITH B P, O'BRIEN T R et al: J Am Vet Med Assoc, 186, 593~599 (1985)
- 8) HIETALA S K, ARDANS A A, SANSOME A: Am J Vet Res, 46, 13~15 (1985)
- 9) ISHINO S, OKA M, NAKAZAWA M, MATSUDA I: Bull Natl Inst Anim Health, 87, 51~61 (1984)
- 10) MAGNUSSON H: Vet Rec, 50, 1459~1468 (1938)
- 11) NAKAZAWA M: Jpn J Vet Sci, 42, 551~555 (1980)
- 12) NAKAZAWA M: Bull Natl Inst Anim Health, 89, 1~10 (1986)
- 13) PRESCOTT J F: Vet Microbiol, 14, 211~214 (1987)
- 14) PRESCOTT J F, MARKHAM R J F, JOHNSON J A: Can J Comp Med, 43, 356~364 (1979)
- 15) PRESCOTT J F, OGILVIE T H, MARKHAM R J F: Am J Vet Res, 41, 2073~2075 (1980)
- 16) SANADA Y, NODA H, NAGAHATA H: J Vet Med Sci, 54, 649~652 (1992)
- 17) SIPPEL W L, KEAHEY E E, BULLARD T L: J Am Vet Med Assoc, 153, 1610~1613 (1968)
- 18) STUDDERT M J: Aust Vet J, 54, 411~417 (1978)
- 19) TAKAI S, KAWAZU S, TSUBAKI S: Am J Vet Res, 46, 2166~2170 (1985)
- 20) WILSON M M: Aust Vet J, 31, 175~181 (1955)
- 21) 安井 正, 本間洲二, 嵯峨伸彦ほか: 第34回北海道地区家畜保健衛生業績発表集録, 123~135 (1986)
- 22) ZINK M C, YAGER J A, SMART N L: Can Vet J, 27, 213~217 (1986)

世界獣医学大会の成功に向けて 参加とご協力を!!

開催名: 世界獣医学大会 (横浜)
World Veterinary Congress — YOKOHAMA

日程: 1995年(平成7年) 9月3日~9日

場所: 神奈川県横浜市みなとみらい
横浜国際平和会議場 (パシフィコ横浜)

主催: 社団法人日本獣医師会
日本小動物獣医師会