

# 豚のブルセラ症試験管凝集反応試験の非特異反応への一考察

仙台家畜保健衛生所  
後藤庸，竹田百合子

## I. はじめに

ブルセラ症は家畜伝染病に指定され、ブルセラ菌の感染による人獣共通感染症である。動物では流産や精巣炎による繁殖障害があり、国内では豚の種畜検査の衛生検査項目に指定されている。国内の豚ブルセラ症は1940年以降の発生報告がない。これまで、豚ブルセラ症の抗体検査は急速凝集反応試験、試験管凝集反応試験及び補体結合反応試験によって行われてきたが、大半の個体は急速凝集反応試験によりブルセラ症陰性と判定されてきたため、試験管凝集反応試験及び補体結合反応試験の国内での実施実績はほとんどない。このような状況下で、令和4年度からブルセラ症急速診断用菌液の製造・販売中止により、豚のブルセラ症抗体検査は、はじめに試験管凝集反応試験を実施し、陰性以外の個体は補体結合反応試験を行うこととなった。

国際獣疫事務局の陸生動物マニュアル<sup>1)</sup>によると、豚の血清によるブルセラ症抗体検査では、試験管凝集反応試験における非特異反応による凝集が他の動物に比べ多いことが記載されている。また、三浦らは<sup>4)</sup>、国内の種豚91頭の109血清において、2頭の非特異反応による疑反応を報告し、本試験法の非特異反応が問題となっている。

今回、令和4年度に県内で飼養する種豚1頭が種畜検査の試験管凝集反応試験で陽性となり、再検査でブルセラ症を否定した事例があった。そこで、陽性事例の詳細及び非特異反応の原因を調査したので報告する。

## II. 豚ブルセラ症の血清学的診断手順

豚ブルセラ症の試験管凝集反応試験は、被検血清を希釈し、等量の菌液を反応させ、凝集の有無と上清の濁度により判断する。判定方法は、凝集度100%から0%までの5本の標準濁度管を作成し、凝集度50%を示した最高血清希釈倍数を抗体価とする。血清の希釈は10倍から160倍までの計5本とし、抗体価10倍以下は陰性、20倍は疑反応、40倍以上は陽性と判定する。また、家畜伝染病予防法施行規則別表第1により疑反応と陽性の一部は再検査、80倍以上の陽性はブルセラ症の患畜と判定される(表1)。なお、疑反応(20倍)及び陽性(40倍)は、補体結合反応試験を実施する(図1)。その結果、疑似患畜となった場合は、14日以上60日以内の間隔をおいて上記試験を繰り返し、3回行う中で患畜にならなければ、陰性と判定する。

表1 試験管凝集反応試験による豚ブルセラ症の判定

血清希釈倍数(倍)	10	20	40	80	160
判定	陰性	疑反応	陽性		
家畜伝染病予防法による判定	陰性	再検査	患畜		



図1 豚ブルセラ症の血清診断の流れ

### Ⅲ. 材料及び方法

#### 1. 豚ブルセラ症血清学的検査

##### 1) 試験管凝集反応試験

県内に所在する一種豚場で飼養されていた種豚の種畜検査のため令和 4 年 4 月から 8 月に採血した血清 162 検体を試験に供した。試験管凝集試験は、抗原(ブルセラ症診断用菌液, (国研)農業・食品産業技術総合研究機構, 茨城)の使用説明書に従い実施した。なお, 疑似患畜 1 頭は判定 15 日後に再度採材し再検査を実施した。

##### 2) 補体結合反応試験

試験管凝集反応試験で陰性以外であった検体について補体結合反応試験用抗原(ブルセラ補体結合反応用可溶性抗原, (国研)農業・食品産業技術総合研究機構, 茨城)の使用説明書に従い実施した。なお, 当該検査は 1 回目の検査で 2 頭, 再検査で 1 頭について実施した。

#### 2. 試験管凝集反応試験に係る非特異反応の原因菌の分離検査

##### 1) 糞便培養検査

ブルセラ属菌の O 抗原は, *Yersinia enterocolitica* O9 抗原や大腸菌 O157 などと交差反応することが知られている。そこで, 試験管凝集反応試験で凝集が認められた個体のうち 10 頭から糞便を採材し検査に供した。10 頭の内訳は, 試験管凝集反応試験で疑反応が 1 頭, 陰性だが凝集を示した個体が 9 頭であり, 陽性個体からの採材はできなかった。なお, 試験管凝集反応試験の判定から糞便の採材までの期間は 3 か月から 7 か月間である。

##### i) *Yersinia* 属菌の分離培養

各検体を滅菌リン酸緩衝液に接種し, ボルテックス後, 4℃ で 4 週間培養後, 培養液を 0.75% 水酸化カリウム加 0.5% 塩化ナトリウム水溶液に加え, 15 秒間アルカリ処理を行い, CIN

寒天培地に塗抹し, 25℃ で 48 時間培養した。

##### ii) *Salmonella* 属菌の分離培養

各検体をハーナテトラチオン酸塩培地で増菌後, DHL 寒天培地に塗抹し, 37℃ 48 時間培養した。

##### iii) 大腸菌 O157 の分離培養

各検体をノボビオン加 mEC ブロスで増菌後, Dynabeads anti-E.coli O157 で選択濃縮し, CT-SMAC 寒天培地に塗抹し 37℃ 48 時間培養した。

##### iv) その他の細菌

各検体を DHL 寒天培地に塗抹し 37℃ 24 時間培養した。

##### v) 生化学性状検査

TSI 寒天培地及び LIM 寒天培地に画線または穿刺し糖の利用性, 硫化水素産生性, リジン脱炭酸酵素の有無等を確認した。また, API 20E (ビオメリュー・ジャパン株式会社, 東京)による試験も実施した。

##### vi) 遺伝子学的検査

農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門にて 16S rRNA 遺伝子領域の塩基配列の解読し, データベース (EZ BioCloud) と照合し, 基準株の配列と比較した。

E.coli O-genotyping PCR (国立大学法人宮崎大学, 宮崎)のプロトコール (Ver.3, 2018.4.5 版)に従い実施した。

#### 3. 分離した大腸菌の試験管凝集反応試験への関与の調査

##### 1) 急速凝集試験

分離された大腸菌がブルセラ症患者血清の含有抗体と結合するか調査した。の牛ブルセラ症患者由来の血清 (補体結合反応試験用抗原(ブルセラ補体結合反応用可溶性抗原, (国研)農業・食品産業技術総合研究機構, 茨城)に付属)と糞便培養検査で分離された大腸菌の高圧蒸気滅菌処

理した菌液を混合し、2分以内に凝集を認めたものを陽性と判定した。

## 2) 大腸菌による吸収試験

急速凝集試験で陽性の大腸菌が試験管凝集反応試験の非特異反応の原因か調査した。当該農場の試験管凝集反応試験で陽性の血清1検体に急速凝集試験の陽性大腸菌の高圧蒸気滅菌処理菌液を5℃一晩感作させ、遠心した上清を検体とした。コントロールとして、牛ブルセラ症患者由来の血清(補体結合反応試験用抗原に付属)も同様の処理を行った。これらの2検体を吸収処理前と後でそれぞれ試験管凝集反応試験を実施し、吸収前後の凝集度の低下を観察した。

## IV. 結果

### 1. 豚ブルセラ症血清学的検査

#### 1) 試験管凝集反応試験

162検体中陽性(40倍)1検体、疑反応(20倍)1検体、陰性160検体であった。

また、陰性ではあったが、20倍希釈血清以下で凝集を認めた検体は17検体あり、その程度は表2に示した。

陽性(40倍)1検体は、15日後に再試験を行った。その結果、疑反応(20倍)まで低下し、疑似患者と判定した。

表2 試験管凝集反応試験の凝集検体一覧

凝集検体 No.	10倍	20倍	40倍	80倍	160倍	判定
1	4	4	3	0	0	陽性(40倍)
2	3	3	1	0	0	疑反応(20倍)
3	3	1	0	0	0	陰性
4	1	0	0	0	0	陰性
5	1	0	0	0	0	陰性
6	1	0	0	0	0	陰性
7	1	0	0	0	0	陰性
8	1	0	0	0	0	陰性
9	2	0	0	0	0	陰性
10	3	1	0	0	0	陰性
11	3	1	0	0	0	陰性
12	2	0	0	0	0	陰性
13	1	0	0	0	0	陰性
14	1	0	0	0	0	陰性
15	3	1	0	0	0	陰性
16	1	0	0	0	0	陰性
17	3	0	0	0	0	陰性
18	3	1	0	0	0	陰性
19	2	0	0	0	0	陰性

(表中の数字0-5:凝集スコア)

## 2) 補体結合反応試験

1回目の検査の2検体(陽性1検体、疑反応1検体)及び再検査の1検体(疑反応)全て抗体価5倍未満で陰性を確認した。

## 2. 試験管凝集反応試験に係る非特異反応の原因菌の分離検査

### 1) 糞便培養検査

i) *Yersinia* 属菌, ii) *Salmonella* 属菌及びiii) 大腸菌 O157 は10頭すべて分離陰性であった。(iv, v及びvi) 10頭中7頭に共通して硫化水素の産生を特徴とする非典型的な大腸菌が分離された。この7頭から各1株分離し、分離大腸菌とした。

## 3. 分離した大腸菌の試験管凝集反応試験への関与の調査

### 1) 急速凝集試験

分離大腸菌7株中1株が牛ブルセラ症患者由来の血清との急速凝集試験で陽性を認めた。

なお、当該大腸菌はE.coli O-genotyping PCRにより、Og113と判明した。

### 2) 大腸菌による吸収試験

当該農場の試験管凝集反応試験陽性血清は、当該大腸菌による吸収前と後で、40倍希釈血清で凝集スコア1の低下を認めた。また、牛ブルセラ症患者由来の血清は、20倍希釈血清で凝集スコア2の低下を認めた(図3)。

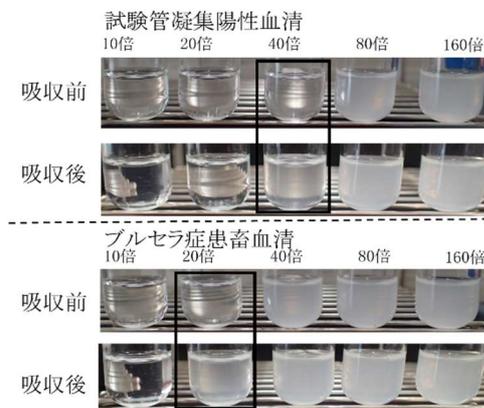


図3 大腸菌Og113による吸収試験結果

## V. まとめ及び考察

今回、豚のブルセラ症試験管凝集において、40倍希釈血清で凝集度50%以上の陽性1検体を確認した。この陽性1検体は、2週間程度の間隔をあけた再検査で、20倍まで低下し、疑反応となった。その後の検査でブルセラ症は否定した。これまで国内では、深沢らが<sup>3)</sup>、1955年6月から56年12月に東京都芝浦と場でと殺された豚1189頭の試験管凝集反応試験を実で、20倍が12頭及び10倍が92頭と報告している。また、三浦ら<sup>4)</sup>、国内の4つの種豚飼育農場で2017年から2021年に飼養されていた種豚91頭の109血清の試験管凝集反応試験で20倍が2血清及び10倍が30血清あったことを報告している。いずれも本事例のように40倍希釈血清で陽性を示した事例はなく、清浄化されたと思われる国内であっても、陽性域での凝集が起こることが明らかとなった。また、Jungersen<sup>2)</sup>らは非特異反応による試験管凝集反応試験の凝集は8週間程度で消失すること報告しており、本事例はこの報告を支持するものであった。

ブルセラ症試験管凝集の非特異反応の原因調査として、当該農場の豚の糞便調査を行ったが、既報のブルセラ属菌のO抗原と交差を示す細菌である、*Yersinia enterocolitica* 血清型O9、*Salmonella enterica* 血清型O30及び*Escherichia coli* O157等は分離されなかった。しかし、1頭の糞便から、ブルセラ症患者血清に凝集する大腸菌Og113が分離された。さらに、その大腸菌を使った吸収試験により、試験管凝集反応試験の陽性検体の血清で凝集度は低下したことから、当該大腸菌が陽性血清含有抗体との結合が確認され、分離された大腸菌Og113がブルセラ症試験管凝集反応の非特異反応を引き起こす可能性が示唆された。なお、Og113を分離

した種豚1頭は、試験管凝集反応試験では、弱い凝集(10倍希釈血清で凝集)を認めたが、非特異反応が出た時の調査ではないことや、強い凝集を認めた個体の糞便検査は未実施のことから、今後、症例を積み重ねる必要がある。

令和4年度から豚ブルセラ症の抗体検査が、試験管凝集反応試験により行われ、当県では、当該農場で15日後の再検査が必要となった。今後、再検査になった場合に種畜検査に間に合わない可能性があることから、農場側で種豚の選定を早める必要が生じた。よって、畜産農家の安定的な経営に関わることから、豚で非特異反応が起こりやすい試験管凝集反応試験に代わる、新たな検査手法の開発を望む。

## VI. 謝辞

多くの助言をいただいた(国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物感染症研究領域細菌グループ及び生物学的製剤製造室製造科品質管理チーム皆様に深謝します。

## VII. 引用文献

- 1) 国際獣疫事務局, Terrestrial manual, ([https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health\\_standards/tahm/3.01.04\\_BRUCELOSIS.pdf](https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.01.04_BRUCELOSIS.pdf)), (accessed 2022-7-4)
- 2) Jungersen G, Differentiation between serological responses to *Brucella suis* and *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 after natural or experimental infection in pigs, *Epidemiol Infect*, 134, 347-357 (2006)
- 3) 深沢平, と畜並びにと畜関係者のブルセラ病に関する調査研究, *日獣会誌*, 220-222 (1957)
- 4) 三浦達弥, 種豚の血清を用いたブルセラ症の試験管凝集反応試験及び補体結合反応試験, *日獣会誌*, 150-156 (2022)