

トリ医者の誤診記録

その9

病性鑑定の手順から抗原の特性まで

株式会社ピーピーキューシー 加藤宏光



病性鑑定の手順

先月号で、伝染性喉頭気管支炎（以下ILT）の抗体検査と診断について触れました。病性鑑定で病名を決定するに際して、いろいろな条件が勘案されます。

① 症状・稟告におけるいろいろな症状や死亡例の発生状況、発病のパターンや経過など

② 病原検査・病原体の分離もしくは確認（顕微鏡検査など）

③ 抗体検査・群の抗体価とその推移（あるいは隣接する群の抗体価）

④ 組織病理学的検査・各疾患の特徴を顕微鏡で確認

以上の状況をかながみて病名を決定することになります。病変が特徴的であり、それに一致する病原体が分離されれば、病名の決定は容易です。しかし、病原体が複数分離されたり特徴的な病変がありながら、病原体が分離されないケースでの診断には注意が必要で

す。

また、抗体価が陽性でも病的状態とは断じきれない場合もあります。さらにはワクチン抗体と野外感染の抗体価が判別困難である場合も想定されます。

先月号のケースではILTの抗体が容易に検査できない条件下で、鶏伝染性気管支炎（以下IB）抗体の推移と現場での群の状況を断面で診断したことで誤診を招きました。現在私の研究所PPQCでルーチンとして検査している抗体には次のようなものがあります。

① NDHI価

② ED S抗体

③ MG抗体（平板急速凝集反応）…必要なら血清希釈法で判定

④ MS抗体（もっぱら種鶏と初生ひな）…必要なら血清希釈法で決定

⑤ IBゲル沈抗体（数種）

⑥ IB Dゲル沈抗体

これに加えて、夏場にはロイコチトゾーンのゲル沈抗体をスクリーニングしますし、また必要に応じて各種ELISA抗体（IB、

伝染性ファブリキウス嚢病（以下IBD）、鶏脳脊髄炎（以下AE）、七面鳥鼻気管炎（以下TRT）の検査も実施します。このほかに、ウイルスの中和抗体やマイコプラズマ・ガリセプチカム（以下MG）、伝染性コリザ（以下IC）のHI抗体といった抗体を要求されることもあります。

ルーチンワークで抗体をできるだけ幅広く検査しようと設計したプログラムでは、ウイルス中和抗体や多数の試験管を使用して複雑な過程を経て実施し、かつ判定に個人差が出やすい試験方法は適当ではありません。そこでよく取り入れられるのが平板上で簡便に取り行われる急速反応や寒天ゲル内沈降反応（ゲル沈）試験、あるいは判定が比較的容易なHIテストが主流となります。

簡便に抗体価が測定できるELISA（酵素抗体法）はコストがかさむ点と感度が鋭敏に過ぎる点が問題で、その使用方法に定見ができていないえませんが、時には非常に有用な方法ではあります。

いろいろな抗体検査法

抗体を調べる方法を以下に整理しました。

(1) 平板急速凝集反応 (平板法)

基準となる抗原液が市販されています。被検血清をガラス平板に一滴載せ、それに抗原液を混釈して一定時間 (通常一分) の間に特徴的な凝集塊が発現した場合、陽性と判定します。一分を超えて発現した場合、程度に応じて疑陽性とし、類族反応が出やすいの

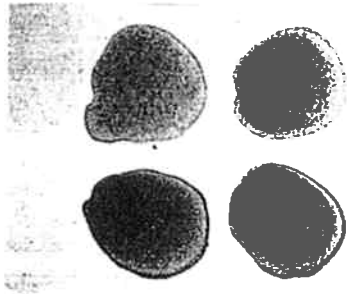
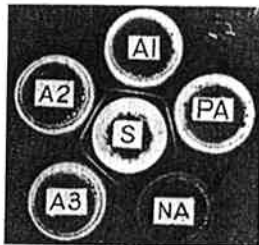
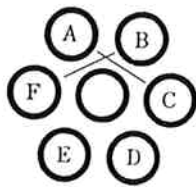


写真1 平板急速凝集反応 (平板法)



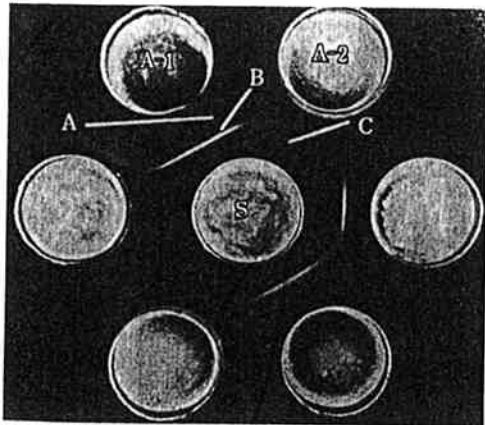
寒天ゲル内沈降反応

S : 免疫血清
PA : S に対する標準抗原
A1 : 可検抗原1
A2 : 可検抗原2
A3 : 可検抗原3
NA : 正常抗原



寒天ゲル内沈降反応

中央の孔には可検血清を、周囲の孔には標準抗原を入れて反応させた。血清にはAとBの抗原に対する抗体が含まれている。



寒天ゲル内沈降反応

A-1、A-2 : 抗原
S : 抗血清
A-1 に対する2本の沈降帯 (A、B) のうちBはA-2 に対する沈降帯とCとA-1 に対する特異沈降帯とからなる

写真2 寒天ゲル内沈降反応

で、意外に注意を要します (MG、マイコプラズマ・シノビエ (以下MS)、ヒナ白痢)。この検査は比較的単純で、採血後静置して分離させた血清を試験用ガラス板に一滴置き、その隣に市販の抗原を垂らして、よく混釈させます。その後、一分間で大きな凝集塊が出現したものを陽性とし、一〜二分で出現するものを擬陽性と判断します。

後に述べますが、この試験は簡便ではありませんが、その他の伝染性疾患に罹患して、急激に高い抗

体を獲得した鶏群では時に非特異抗体と呼ばれるものが出現し、判断を混乱させます (写真1)。

(2) 寒天ゲル内沈降反応 (寒天ゲル沈試験)

一〜一・五%の寒天に対抗する穴を開け、一方に抗原液を、他方に被検血清を入れて、室温もしくは四〇°C (時には三七°C) で静置します。三〜四日後に二つの穴の間に沈降線が確認できれば陽性となります。ニワトリの場合には寒天を調整する際に七〜九%の塩化ナトリウムを添加する必要があります

(PPQCでは九%添加)。単純な方法ですが、抗原さえ調整できれば何にでも適用できますので、継続的にスクリーニングするのに向いた方法です (写真2)。

(3) HI (ニワトリ赤血球凝集阻止反応) 試験

ニワトリの赤血球を凝集する能力を有する病原体にはND (ニューカッスル病)、EDS (産卵低下症候群)、AI (ニワトリインフルエンザ) といったウィルスのほかにMGやIC (ヘモフィルス・パラガリナラム) があります。

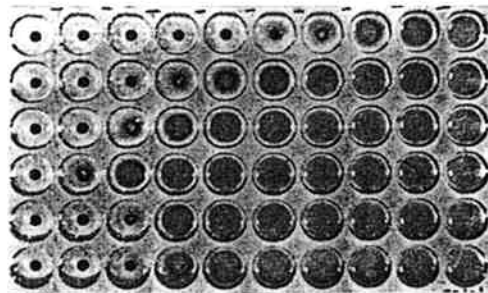


写真3 HI(ニワトリ赤血球凝集阻止反応)試験

こうした病原の抗体に対してはこの性質を利用してHI(ニワトリ赤血球凝集阻止)抗体の検査が行えます。方法は少し複雑です。写真3を参照してください。まず、被検血清を二倍段階希釈します。各希釈血清に一定量の病原液を加え、一五〜二〇分感作させます。各希釈血清に加えられた病原体を殺す(と便宜的に解釈してください)に十分な抗体を含んでいたとすれば、その希釈血清と病原液の混雑液には感作後には生きた病原体(と便宜的に考えてください)

表1 ウイルス中和試験の実施例

血清	血清希釈倍数	1:1 (4 ⁰)	1:4 (4 ⁻¹)	1:16 (4 ⁻²)	1:64 (4 ⁻³)	1:256 (4 ⁻⁴)	1:1024 (4 ⁻⁵)	1:4096 (4 ⁻⁶)	中和価
正常血清		4/4	4/4						—
被検血清①			0/4	0/4	1/4	3/4	4/4		4 ^{-3.50} .1:128
被検血清②		0/4	2/4	3/4	4/4	4/4			4 ^{-1.25} .1:6
陽性血清					0/4	1/4	2/4	4/4	4 ^{-4.75} .1:724
使用したウイルスの定量									
ウイルスの希釈		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	TCID ₅₀ /0.1 ml			
細胞変性効果		4/4*	4/4	2/4	0/4	10 ^{-2.0}			

*分母は各血清希釈に使用した試験管の数、分子は細胞変性効果を現した試験管の数を示す

はないこととなります。この後、各血清と病原液の混雑したもの的一定量のニワトリ血球液を加えて三〇〜四五分静置します。この間に病原体が生き残っていた試験管では血球が凝集されますし、病原体が死滅していた場合には血球に

は影響がありません。十分な時間経過後に真上から観察すると、凝集のない場合には血球が中央に集まり、限界明瞭な日の丸のように見えます。一方、赤血球が病原体によって凝集された場合には、管の底にまんべんなく凝集塊が付着します。この差異を判定して、HI抗体のレベルを測定するのがHIテストです(写真3)。

(4) ウイルス中和試験

ウイルス中和試験には血清希釈法とウイルス希釈法があります。いずれにしても、試験実施の前に被検血清を五六°Cで一五〜二〇分加熱して(温浴、非特異抗体(何にでも反応する抗体)を非働化します。この後、表1に示した手順で血清中のウイルスの殺滅能力を測定します。この際に、ウイルスと血清の混雑液のなかに感染力が残っているかどうかを検定するの、生きた細胞が必要です。この用途に用いられるのが、発育鶏卵や培養細胞です。発育鶏卵は九〜一一日間孵卵された種卵のことで、接種部位としては、漿尿膜

腔や膜上あるいは卵黄内があります。また培養細胞にはもっぱら腎臓の細胞が用いられます。接種された混雑液にウイルスの感染力が残っていたら細胞には特異な反応が出ますので、これらの発現状況をみて抗体レベルを判定します。

(5) 試験管内凝集反応

この試験はHI試験とよく似た手順で行われます。MGやICに対して行われるほか、ヒナ白痢症の市販抗原を用いてサルモネラ(特にSE)の汚染をスクリーニングするのに応用されます。二倍段階希釈した被検血清に、やはり定量希釈した抗原液を加え、三七°Cで二時間程度感作させてから、一晚四°Cで冷蔵静置した後、試験管を光にかざしながらゆつくりと振り、凝集物ができているかどうかを観察します。凝集物があれば抗体陽性です。この判定にはかなりの熟練が要求されますので、一般的にはルーチン化されません。

(6) ELISA(酵素抗体法)試験
酵素で標識された抗原を段階希釈した被検血清に加え、光の透過

性をもって抗体の有無を判断するのですが、特殊に過ぎますので詳述は避けます。

抗体のもつ意義

前項で述べた方法によつて測定される抗体というものは、病原体が体内で増殖した証拠として残される当該病原体への抵抗力です（本当は病原体に限らず、体内へ侵入したどのような異種の蛋白に対しても形成されるものです）。

ワクチン接種を受けていないにもかかわらず特定の抗体を認めたとすることは、「過去にこの病原体が体内で繁殖した」という証拠になります。どれくらいの過去に感染を受けたかを推定するためには、経時的な抗体レベルの追跡が必要となります。すなわち、抗体は通常感染の極期から三〜四週目でピークに達するからです。同一鶏群を隔週で追跡していれば、抗体価の推移がわかりますから、ピークから三〜四週さかのぼった時点が

感染のピークで、それよりさらに三〜四週前に群の感染が始まったと考えると、ほとんどの事例で思い当たる要因がピックアップできます。

しかしながら、これが疾患の本態であると断定することは容易ではありません。確かに単純な感染症で、しかもそれがIBやNDあるいは産卵低下症候群¹⁾の(以下EDS)のように、わが国において存在が確認されている場合は比較的容易です。しかし、検査方法が普及していないとか、病原体の存在そのものが認知されていないケース、あるいは複合感染でいろいろな病原体の抗体が同時に上昇している場合は診断が困難である場合がしばしばです。

PPQCにおいては各農場で、月に一〜二回で巡回して採血しますし、また必要と感じた場合には臨機応変に採材し、各種の病勢鑑定を実施しています。ですから、各鶏群の抗体推移が追跡可能なうえ、おのおの鶏群や当該農場の特性もよく把握されています。従

つて、抗体価のみで診断を下すことはありません。もつとも私がかつて味わった苦い経験が危険を回避するに役立つているのかも知れません。

先にも述べたように、検出された抗体が唯一のものであるかどうかは実際に見極めることが難しいものです。ちなみに前述した例ですが、感染のパターンが明らかにされたものに「アデノウイルス感染症」があります。このなかにIBDの感染に伴つて強い病原性を発揮することがあります。このウイルスは、本来は育成期間に不顕性感染をして抗体が陽転する

ことが多いものです。私が二〇年近く前に数カ所の農場で継続的に検査した結果でも、いずれの農場でも六〇〜七〇日齢時点ですべて陽転していました。時に、プロイラーで封入体性肝炎を引き起こすことがありますが、そのメカニズムは明らかではありません。

ある鶏種が、わが国に導入された時のことです。IBDの感染に伴つてアデノウイルス性と推察さ

れる封入体肝炎が頻発しました。当初は私もその因果関係を推定することができませんでした。

その当時には「IBDは育成期間に一度感染すると二度と感染しないもの」と解釈されていました。IBDのみでなく、人の麻疹や風疹などについても、幼児期にワクチン摂取すると一生感染しないものと受け止められていました。一方、NDの生ワクチンはその防御効果は三カ月程度で、その後適正な追加ワクチンが必要とされていることも（前述の免疫観念とは相異なりますが）常識的に知られています。

私は野外の状況をつぶさに観察し、「IBDは時に成鶏期間で再感染しうるものであり、その基本的な態度はNDやIBのものと同じと考えられる」と確信していました。その基礎には、IBDゲル沈試験で抗原を薄めに調整して、経時的な検査を実施すると「三〇〇〜三六〇日齢ころに一度抗体陽性率が低下し、その後再び上昇する」という経験をたびたびしてい

たからです。

また、当時はIBDに汚染されていない農場も散見されました。こうした農場が汚染される経過をたまたま観察する機会に恵まれました。こうした農場では、封入体肝炎がIBDの侵入前と侵入後で別ものような被害をもたらしました。すなわちIBDが感染するまではほぼマニュアルに準じて産卵していた当該鶏種の群がIBD感染後に特徴的な黄疸症状を呈し、みるみるうちに産卵率が低下していききました。順調であったときの産卵率が八三〜八四%（三五〇日齢）であったのが、IBD感染後（IBD抗体陽転後）は週に二%以上も低下し、底をつくことなしに三カ月後には六〇%を切るまでに低下していました。こうした鶏群が当時どこでもみられました。が、別の農場では隣接して、別の鶏種を飼育していたために性能の比較検討が実施できました。そして、この農場におけるこの鶏種の最終産卵率は三八%（五四五日齢時点）にまで下がったのです。

こうしたいろいろな感染例（黄疸発生と産卵低下）をいくつも観察するうちに、黄疸発生とIBDゲル沈抗体陽性率の低下と上昇の時期に一致して、かの黄疸症状（私達はイエローフェイスと呼んでいました）が発現することに気が付いたのでした。

この症例の肝臓の顕微鏡標本を母校の研究室（大阪府立大学獣医学科病理学研究室）へ持ち込み、封入体肝炎という自分の下した診断が正しいことを確認してもらいました。

残念ながら、この症例群では明確な病原特定ができず、そのために正確な診断が下されることもありませんでした。多くは「IB+MG感染と考えてすませていた」と聞いています。

明確な診断根拠がないときに、その時点でたまたま陽性となった病原体が産卵障害の原因として取り扱われることはしばしば冒される間違いといえます。こうした診断に基づいた対策はもちろん効果を示しませんが、それが無効

であることが明らかになるまでに半年や一年が過ぎてしまうことも少なくありません。その間の損失を考えると恐ろしいものがあります。

マイコプラズマを例にとつて

MGと略称されるマイコプラズマ・ガリセプティクムは、生産性阻害の主役として扱われています。マイコプラズマという細菌は大型のウイルスにも匹敵するほど微細な細菌で、増殖させるにも非常に厳しい栄養条件を要求します。もっぱら人に感染するものもあり、インフルエンザに引き続いてマイコプラズマ感染で肺炎を併発し、時に生命の危険をも憂慮しなければならぬこともあります。実際に私がインフルエンザに感染したとき、マクロライド系抗生物質で二次感染を押さえると悪化するのを防衛することも少なくないことを経験しています。

しかし、ニワトリのMGがどの

程度の病原性を有するものかを確定的に伝える情報に出くわすことは多いとはいえません。例えば、MGワクチンを接種された鶏群で鼻汁が漏出する場合、「これがMGの感染に起因するものでない」と断言できるほどの調査をしているかどうか、また「産卵低下以外に特徴的な症状を呈しない症例でMG抗体のみが陽転しているようにみえる場合はどのように判断すればよいのか」といった難解な問題に明確な答えを呈することは現実には極めて困難です。ただ診断を下せばことがすむならば、その答えは難しいものではありません。というより、「診断はどのようについてもよい」のです。なぜなら、産卵障害を解決することを目的とした対処の必要がないからです。しかし、趣味の世界ではないのですから、野外では何らかの対策を講じることが要求されます。

誤解を恐れずにさらに少し言葉を進めれば、仮にMG感染が原因でない産卵障害をMG感染に由来するものと誤診したとしましよ

う。とりあえずMGのワクチンを使用する人が多いのは当然です。しかしながらMG感染が起因しているのではないのですから、当然「生産性の改善はみられない」という現実に直面します。

問題はその次の段階で、MGワクチンが有効とは思えない状況（もちろん生産性は依然として悪い）でありながら、多くの場合このワクチンネーションを継続しています。こうしたケースに遭遇した時に「どうしてMGワクチンを継続しているのか」を聞くと、「なんとなくやめられない」とか「やめて悪くなつてはいけないから」という答えが返ってきます。「ではやめてみてはいかがですか」と奨めると、だいたいのケースでは「とりあえずやめてみます」といつて試験的にMGワクチンを中止しますが、ほとんどの場合でこのためにさらに成績が低下していません。誤診の内包するもう一つの問題点がここにあります。

とはいえ、「MGの与える経済被害がない」とか「無視してよ

い」と言っているわけではありませんが、「MGにも病原性の差という」株の差もあることでしょうか。また「MGワクチンネーションで成績が安定した」という例もよく見聞することです。

MGとMSについて

しばらくMGやMSを課題として取り上げてみましょう。

MGと関節炎が本来の病態とされるMS（マイコプラズマ・シノヴィアもしくはサイノヴィアエ）はかつては生産性阻害の最大の要因とされてきました。先月号でも触れたように、何らかのウイルス感染に伴ってマイコプラズマの感染が起きると、予後が不良となることはよく知られています。特に、過酷な密飼いのストレスと背中合わせで、急速な体重の増加が迫られるプロイラーでは今でもIBとマイコプラズマの重複感染に大腸菌などが感染するという、いわば古典的なパターンでの減耗に

悩まされるケースが多いと聞いています。しかし、採卵鶏ではマイコプラズマのなかでも産卵への影響の主たる原因とされるMGに対してはワクチンネーションによる対応が実施されます（これで被害が抑えられない場合には、その被害がMGによるものではないと断定してもよいものかどうかは、私は多少の疑問を抱いてはいるのですが……）。また、「MSの感染では産卵への影響がほとんど認められることはない」ということも多くの生産者は認知しています。

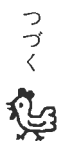
しかしながら、現在でもMGやMSといった抗体価が種鶏の衛生管理のマーカーとしての役割を担わされることが多いことは事実です。こういった抗体が時にIBDワクチンのリアクションや不活性化ワクチン（なかでもオイルワクチンのように強いストレスを与えるものや、IBDを含めた不活性化ワクチン）の接種後に一過性に現れることがあります。こうした抗体を非特異抗体と呼びます。何にでも反応する抗体という意味で

す。この非特異抗体は一過性のもので現れてから三〜四週で自然に消えるものです。

一方、MGやMSの抗体が衛生管理の不備をチェックする指標のように受け止める傾向があるために、あらぬ疑いをかけられることもあります。

抗原の特性

MGやMSの抗原は現在数社から市販されていますが、私が鶏病に携わったことにはMSどころかMGの抗原でさえ自作して検査していたものでした。その後、MGもMSも市販抗原で検査するのが当たり前のようになり止められています。しかし、現在市販されている抗原の感度は一定でしょうか？ 私の研究所で実施した検査結果を基にすれば抗原の感度は決して一定とはいえません。



つづく