

# 馬パラチフス血清学的検査における DTT-MATの有用性

高橋弘康<sup>1)†</sup> 丹羽秀和<sup>2)</sup> 八木 梓<sup>3)</sup> 信本聖子<sup>1)</sup> 片山芳也<sup>2)</sup>  
松田芳和<sup>4)</sup> 立花 智<sup>1)</sup> 安斉 了<sup>5)</sup>

- 1) 北海道十勝家畜保健衛生所 (〒089-1182 帯広市川西町基線59-6)
- 2) 日本中央競馬会競走馬総合研究所 (〒329-0412 下野市柴1400-4)
- 3) 北海道農政部 (〒060-0003 札幌市中央区北3条西6)
- 4) 日本中央競馬会馬事部 (〒105-0003 港区西新橋1-1-19)
- 5) (公財)競走馬理化学研究所 (〒320-0851 宇都宮市鶴田町1731-2)

(2018年12月31日受付・2019年6月12日受理)

## 要 約

ジチオスレイトール (DTT) で処理した馬パラチフス発生馬群 (異常産馬と同居馬) の経過血清, 発生牧場周辺の発生地域馬群及び非発生地域馬群の血清を用い, マイクロ凝集反応法 (DTT-MAT) を実施した. 異常産馬全頭で DTT-MAT が陽性 (≧20倍) となり, 発症後の経過により MAT が陰転後も DTT-MAT で抗体陽性が持続した. 同居馬でも DTT-MAT 陽性馬 (42.1%) が認められた. 発生地域馬群及び非発生地域馬群の DTT-MAT 陽性率は 4.5%, 0.1% であった. DTT-MAT 陽性の 64 検体は, 1 検体を除き馬パラチフス菌の LPS を用いた ELISA で抗 LPS 抗体 (IgG, IgA) の存在が示唆された. 以上から, DTT-MAT は馬パラチフスの感染後に出現する O4 抗原に対する抗体を鋭敏かつ長期間検出できる方法と考えられた.

——キーワード: ジチオスレイトール処理, 馬パラチフス, マイクロ凝集反応, O4 抗原.

-----日獣会誌 72, 601~607 (2019)

馬パラチフス (本病) は, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abortusequi (4,12:-:e,n,x, 本菌) が感染することにより, 馬に流産や化膿巣の形成, 関節炎等を引き起こすサルモネラ感染症 [1] であり, 家畜伝染病予防法において届出伝染病に指定されている. 本病の診断には病原学的検査と血清学的検査が用いられているが, 本菌は糞便中に排菌されることがなく, 病原学的検査による感染の確認は困難なため, 輸入検疫や種畜等, 健康畜の検査では血清学的検査が用いられている.

現在の血清学的検査は, 菌体 (O4) 抗原に反応する抗体と菌体との凝集を確認する手法であり, 試験管凝集反応法 (TAT) [2] 及びマイクロ凝集反応法 (MAT) [3] がある. 凝集反応である TAT や MAT では血清中抗体のおもに IgM が検出されるが, IgM は感染初期抗体や

感染の有無によらず血清中に存在して, ささまざまな抗原と結合する自然抗体 [4] の主体となる抗体であり, その特異性は IgG より低い.

抗原特異性の高い IgG を効率良く検出する方法として, 以前から血清の 2-メルカプトエタノール (2ME) 処理 [5] が用いられており, ブルセラ病 [6] や, 馬パラチフス (中野良宣, 第 34 回北海道家畜衛生業績発表会集録, 1986) の診断等に活用されてきたが, 2ME は平成 20 年 7 月に毒物指定され, 取り扱いにさまざまな制限が伴うこととなった.

ジチオスレイトール (DTT) も, 2ME と同じく抗体のジスルフィド結合を切断することにより IgM を不活化する作用を持つ [5] ことから, 今回, 本病発生馬群, 発生地域馬群及び非発生地域馬群の血清について MAT を実施するとともに, 血清や抗原の希釈液に

† 連絡責任者 (現所属): 高橋弘康 (北海道網走家畜保健衛生所)

〒090-0008 北見市大正 323-5 ☎0157-36-0725 FAX 0157-36-5801

E-mail: takahashi.hiroyasu@pref.hokkaido.lg.jp

DTTを加えた MAT (DTT-MAT) を実施し、その有用性について検討した。

## 材料及び方法

**発生概要：**本病発生農場は、北海道十勝管内（管内）において繁殖雌馬 15 頭、種雄馬 1 頭、育成馬 8 頭を飼養していた。平成 25 年 12 月 28 日～平成 26 年 1 月 28 日に 8 頭が流産し、2 頭の流産胎子（1 月 13 日流産）及び 1 頭の生殖器スワブ（1 月 19 日流産）から本菌を分離したことから、獣医師は当該馬 3 頭を本病と診断した。平成 26 年 1 月 14 または 15 日～平成 28 年 4 月 25 日に、経時的に血清及び生殖器スワブを採材し、抗体価の測定並びに菌分離を実施した。

**供試血清：**本病の疫学的背景の異なる血清 1,653 検体を用いた。内訳は、発生馬群として、本病発生農場に繋養されていた馬の経過血清 231 検体（異常産馬 8 頭 77 検体、同居馬 21 頭 154 検体）、発生地域馬群として、同時期に管内の他の農場 161 戸で飼養されていた馬の血清 619 検体、非発生地域馬群として、本病の発生が報告されていない滋賀県の競走馬の血清 803 検体であった。

**MAT：**市販の診断用抗原（馬パラチフス急速診断用菌液、国研農業・食品産業技術総合研究機構、茨城）を用い、丹羽ら [3] の報告により実施した。判定は、320 倍以下が陰性、640 倍が疑陽性、1,280 倍以上が陽性である。

**DTT-MAT：**最終濃度が 0.01M となるように DTT (Sigma-Aldrich, U.S.A.) を加えた滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4) を診断用抗原並びに血清の希釈に用い、MAT と同様に実施した。本研究では、検出限界である凝集価 20 倍以上を DTT 処理に耐性を示す抗体 (DTT 耐性抗体) が存在すると考え、DTT-MAT 凝集価陽性と判定した。

**LPS-ELISA：**DTT 処理血清における *S. Abortusequi* の O4 抗原への反応性を確認するため、Lipopolysaccharide (LPS)-ELISA を実施した。手法は、Gall ら [7] の方法を参考にして実施した。市販の本菌抽出 LPS 抗原 (Sigma-Aldrich, U.S.A.) を、0.05M 炭酸／炭酸水素ナトリウム バッファー (pH9.6) を用いてマイクロプレートに固相化した後、5%ブロッキング剤 (イムノブロック、DS ファーマバイオメディカル株、東京) 及び 0.5% Tween 20 加リン酸緩衝生理食塩水で 100 倍に希釈した馬血清と反応させた。血清中抗体の検出には、ペルオキシダーゼ標識抗ウマ IgG ウサギ抗体 (Rockland antibodies & assays, U.S.A.) または抗ウマ IgA ヤギ抗体 (Bethyl laboratory Inc., U.S.A.) を用いた。判定は、TAT が陰性 (320 倍以下) 及び DTT-MAT と高い相関が確認されている 2ME-MAT で陰性であった

馬血清 47 検体の平均 OD 値+3SD (信頼区間 99.73%) をカットオフとした (未掲載データ)。本研究では、抗ウマ IgG ウサギ抗体、抗ウマ IgA ヤギ抗体を用いた LPS-ELISA のカットオフ値をそれぞれ 0.12、0.23 とした。

**菌分離：**異常産馬 58 検体 (実 8 頭)、同居の妊娠馬 22 検体 (実 7 頭)、非妊娠馬 7 検体 (実 2 頭)、種雄馬 3 検体 (実 1 頭) の生殖器スワブを用いた。MAT で継続して疑陽性を示した非妊娠馬 1 頭は、病理解剖後、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、空腸パイエル板、回腸パイエル板、腸内容、胸腺、腸間膜リンパ節、鼠径リンパ節、扁桃、骨髄、卵巣、前腸間膜動脈及び血液を採材し、菌分離に供した。方法は、緩衝ペプトン水 (栄研化学株、栃木) または EEM プイヨン (日水製薬株、東京) で前培養後、ハーナ・テトラチオン酸塩基礎培地 (栄研化学株、栃木) で増菌培養し、培養液を DHL 寒天培地 (栄研化学株、栃木) または ES サルモネラ寒天培地 II (栄研化学株、栃木) に塗布した。同定及び血清型別は、常法により実施した。

**統計処理：**非発生地域馬群、発生地域馬群及び発生馬群 (平成 26 年 1 月 14、15 日採材) における、DTT-MAT 凝集価が陽性と判定された馬の割合について、Fisher の正確確率検定により多重比較した。なお、多重比較における *P* 値の調整法は、Benjamini と Hochberg の方法を適用した。また、DTT-MAT 凝集価が陽性と判定された検体と LPS-ELISA で IgA、IgG のいずれかまたは両方が陽性と判定された検体との間の一致度を評価するため、発生馬群の結果を用いコーエンの kappa 係数 [8] を算出した。

## 成 績

発生馬群の異常産馬 (A～H) における MAT、DTT-MAT 凝集価、LPS-ELISA 値及び菌分離の推移を表 1 に示す。MAT では 8 頭中 5 頭 (B, C, E, G, H)、DTT-MAT では全 8 頭が凝集価の判定において陽性となった。MAT 凝集価の判定が疑陽性、陽性となった 29 検体は、DTT-MAT 凝集価の判定においても陽性であった。発症後の時間の経過に伴い、6 頭 (A, B, C, D, F, H) において MAT 凝集価の判定が陰転したが、DTT-MAT 凝集価の判定では 4 頭 (A, B, C, F) で陽性が継続し、発生後約 2 年が経過した後に追跡できた 6 頭 (A, B, C, D, F, H) でも陽性となった。LPS-ELISA に供試した 16 検体中、DTT-MAT 凝集価が陽性と判定された 13 検体は IgG、IgA のいずれかまたは両方で ELISA 値の判定が陽性となったが、DTT-MAT 凝集価が陰性と判定された 3 検体は異常産の前または直後に採取された血清であり、IgG、IgA のいずれも ELISA 値の判定が陰性であった。なお、全頭の生殖器スワブから

表1 発生馬群（異常産馬）における MAT, DTT-MAT 凝集価, LPS-ELISA 値及び菌分離の推移

個体	生年月日	異常産日	検査法	採材年月日										
				平成 26 年										平成 28 年
				1 月 14, 15 日	1 月 21 日	1 月 27, 28 日	2 月 10 日	2 月 24 日	3 月 10 日	3 月 24 日	4 月 7 日	4 月 21 日	12 月 1 日	4 月 25 日
A	平成 19 年 5 月 1 日	平成 25 年 12 月 28 日	MAT	640	NT <sup>*3</sup>	640	320	320	320	160	320	320	320	160
			DTT-MAT	160	NT	160	160	160	160	160	160	80	80	80
			IgG-ELISA <sup>*1</sup>	0.81(+)	NT	NT	NT	NT	0.81(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			IgA-ELISA <sup>*2</sup>	0.83(+)	NT	NT	NT	NT	0.52(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			菌分離	+	NT	-	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
B	平成 19 年 4 月 6 日	平成 26 年 1 月 10 日	MAT	160	NT	1,280	1,280	640	640	1,280	1,280	640	320	320
			DTT-MAT	<20	NT	80	80	80	160	320	320	160	40	80
			IgG-ELISA	0.04(-)	NT	NT	NT	NT	0.60(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			IgA-ELISA	0.15(-)	NT	NT	NT	NT	1.07(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			菌分離	+	NT	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT
C	平成 21 年 3 月 20 日	平成 26 年 1 月 10 日	MAT	320	NT	1,280	1,280	320	320	160	160	160	320	320
			DTT-MAT	20	NT	40	80	40	40	40	40	20	80	80
			IgG-ELISA	0.38(+)	NT	NT	NT	NT	0.62(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			IgA-ELISA	0.75(+)	NT	NT	NT	NT	0.84(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			菌分離	+	NT	+	-	-	-	-	-	NT	NT	NT
D	平成 22 年 4 月 22 日	平成 26 年 1 月 11 日	MAT	320	NT	640	320	160	160	160	160	160	160	160
			DTT-MAT	<20	NT	40	20	20	20	<20	<20	<20	<20	20
			IgG-ELISA	0.08(-)	NT	NT	NT	NT	0.23(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			IgA-ELISA	0.21(-)	NT	NT	NT	NT	0.19(-)	NT	NT	NT	NT	NT
			菌分離	-	NT	-	+	-	-	-	-	NT	NT	NT
E	平成 19 年 4 月 6 日	平成 26 年 1 月 13 日	MAT	5,120	NT	2,560	640	320	160	160	160	160	640	NT
			DTT-MAT	320	NT	320	160	80	80	80	40	40	320	NT
			IgG-ELISA	0.34(+)	NT	NT	NT	NT	0.53(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			IgA-ELISA	1.01(+)	NT	NT	NT	NT	0.67(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			菌分離	+	NT	+	+	-	-	-	-	NT	NT	NT
F	平成 21 年 4 月 1 日	平成 26 年 1 月 13 日	MAT	640	NT	640	320	320	160	160	160	160	320	320
			DTT-MAT	80	NT	80	80	80	40	40	40	40	80	80
			IgG-ELISA	0.32(+)	NT	NT	NT	NT	0.45(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			IgA-ELISA	0.98(+)	NT	NT	NT	NT	0.69(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			菌分離	+	NT	-	+	-	-	-	-	NT	NT	NT
G	平成 11 年 2 月 5 日	平成 26 年 1 月 19 日	MAT	640	NT	1,280	1,280	2,560	1,280	1,280	1,280	1,280	NT	NT
			DTT-MAT	40	NT	40	80	80	320	320	320	160	NT	NT
			IgG-ELISA	0.03(-)	NT	NT	NT	NT	0.78(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			IgA-ELISA	0.67(+)	NT	NT	NT	NT	1.28(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			菌分離	NT	+	-	-	-	-	-	-	-	NT	NT
H	平成 18 年 4 月 8 日	平成 26 年 1 月 28 日	MAT	80	NT	320	1,280	1,280	640	160	160	160	80	160
			DTT-MAT	<20	NT	<20	80	160	80	80	40	40	<20	40
			IgG-ELISA	0.03(-)	NT	NT	NT	NT	0.67(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			IgA-ELISA	0.13(-)	NT	NT	NT	NT	0.92(+)	NT	NT	NT	NT	NT
			菌分離	NT	NT	+	+	-	-	-	-	-	NT	NT

\*1, 2: 数値は ELISA 値, ( ) 内は判定を示す

\*3: 検査未実施

本菌が分離された。

発生馬群の無症状同居馬における MAT, DTT-MAT 凝集価及び LPS-ELISA 値の推移を表 2, 3 に示す。4 頭 (I, M, Q, R) 7 検体で MAT 凝集価が疑陽性と判定され、うち 6 検体は DTT-MAT 凝集価でも陽性と判定された。なお、陰性と判定された 1 検体 (I: 平成 26 年 1 月 14, 15 日採材) は、発生時に採取された血清で

あった。また、DTT-MAT 凝集価が陽性と判定された 23 検体では、1 検体 (J: 平成 26 年 2 月 10 日採材) を除きすべてで LPS-ELISA において IgG と IgA のどちらか一方または両方が検出された。DTT-MAT 凝集価が陰性と判定された 12 検体では、LPS-ELISA 値の判定において 2 検体 (K: 平成 26 年 3 月 10 日, 4 月 7 日採材) が IgG のみ陽性、3 検体 (I, M, S: 平成 26 年

馬パラチフス血清学的検査における DTT-MAT の有用性

表2 発生馬群（無症状同居馬：妊娠馬と子馬）における MAT, DTT-MAT 凝集価及び LPS-ELISA 値の推移

馬群	個体 (生年月日)	検査法	採材年月日				平成 26 年					平成 28 年
			1 月 14, 15 日	1 月 27 日	2 月 10 日	2 月 24 日	3 月 10 日	3 月 24 日	4 月 7 日	4 月 21 日	12 月 1 日	4 月 25 日
妊娠馬 (n=8)	I* <sup>1</sup> (平成 17 年 3 月 13 日)	MAT	640	640	320	160	160	160	160	160	640	640
		DTT-MAT	<20	20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	160	160
		IgG-ELISA* <sup>2</sup>	0.04(-)	0.12(-)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		IgA-ELISA* <sup>3</sup>	0.53(+)	0.73(+)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	J (平成 7 年 3 月 1 日)	MAT	320	320	160	160	160	80	160	160	160	NT
		DTT-MAT	<20	<20	20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	NT
		IgG-ELISA	0.03(-)	NT	0.03(-)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		IgA-ELISA	0.13(-)	NT	0.23(-)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	K (平成 12 年 3 月 28 日)	MAT	160	320	160	160	160	160	160	160	160	NT
		DTT-MAT	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	NT
		IgG-ELISA	0.01(-)	NT	NT	NT	0.15(+)	NT	0.43(+)	NT	NT	NT
		IgA-ELISA	0.04(-)	NT	NT	NT	0.07(-)	NT	0.10(-)	NT	NT	NT
	L (平成 21 年 2 月 10 日)	MAT	80	320	80	40	40	40	40	40	640	640
		DTT-MAT	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	160	160
	M (平成 20 年 2 月 18 日)	MAT	160	160	160	160	320	640	320	320	160	320
		DTT-MAT	<20	<20	<20	<20	<20	80	40	40	<20	80
IgG-ELISA		0.04(-)	NT	NT	NT	NT	0.46(+)	0.54(+)	0.52(+)	NT	NT	
IgA-ELISA		0.37(+)	NT	NT	NT	NT	0.86(+)	0.80(+)	0.65(+)	NT	NT	
N (平成 15 年 4 月 20 日)	MAT	160	160	160	160	160	320	160	160	160	160	
	DTT-MAT	<20	<20	<20	<20	20	20	40	40	<20	40	
	IgG-ELISA	0.02(-)	NT	NT	NT	0.25(+)	0.44(+)	0.44(+)	0.37(+)	NT	NT	
	IgA-ELISA	0.18(-)	NT	NT	NT	0.57(+)	0.82(+)	0.74(+)	0.61(+)	NT	NT	
O (平成 22 年 3 月 5 日)	MAT	160	80 320	160	80 160	80 160	80 160	160	80	80 160	160* <sup>4</sup>	
	P (平成 21 年 2 月 15 日)	DTT-MAT	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	20	
子馬 (n=8)	i* <sup>1</sup> (平成 26 年 1 月 1 日)	MAT	20	20	20	<20	20	NT	80	NT	NT	NT
		DTT-MAT	<20	<20	<20	<20	<20	NT	20	NT	NT	NT
		IgG-ELISA	0.01(-)	NT	NT	NT	NT	NT	0.24(+)	NT	NT	NT
		IgA-ELISA	0.05(-)	NT	NT	NT	NT	NT	0.23(-)	NT	NT	NT
	j (平成 26 年 1 月 4 日)	MAT	40	20	<20	<20	20	NT	80	NT	NT	NT
		DTT-MAT	<20	<20	<20	<20	<20	NT	40	NT	NT	NT
		IgG-ELISA	0.02(-)	NT	NT	NT	NT	NT	0.28(+)	NT	NT	NT
		IgA-ELISA	0.03(-)	NT	NT	NT	NT	NT	0.24(+)	NT	NT	NT
	k (平成 26 年 1 月 8 日)	MAT	80	20	<20	40	80	NT	160	NT	NT	NT
		DTT-MAT	<20	<20	<20	<20	40	NT	80	NT	NT	NT
	l (平成 26 年 1 月 25 日)	MAT	NT	80	<20	<20	<20	NT	<20	NT	NT	NT
		DTT-MAT	NT	<20	<20	<20	<20	NT	<20	NT	NT	NT
	m (平成 26 年 3 月 20 日)	MAT	NT	NT	NT	NT	NT	80	<20	<20	NT	NT
		DTT-MAT	NT	NT	NT	NT	NT	<20	<20	<20	NT	NT
	n (平成 26 年 4 月 21 日)	MAT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	<20	<20	NT	NT
		DTT-MAT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	20	<20	NT	NT
o (平成 26 年 4 月 5 日)	MAT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	<20 40	NT	NT	
	p (平成 26 年 4 月 8 日)	DTT-MAT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	<20	NT	NT	

\*1：大文字と小文字間は、親子関係を示す

\*2, 3：数値は ELISA 値, ( ) 内は判定を示す

\*4：個体 O のみ

表3 発生馬群（無症状同居馬：非妊娠馬と種雄馬）における MAT, DTT-MAT 凝集価及び LPS-ELISA 値の推移

馬 群	個体 (生年 月日)	検査法	採材年月日									
			平成 26 年								平成 28 年	
			1 月 14, 15 日	1 月 27 日	2 月 10 日	2 月 24 日	3 月 10 日	3 月 24 日	4 月 7 日	4 月 21 日	12 月 1 日	4 月 25 日
非妊娠馬 (n=4)	Q (平成 24年 3月 30日)	MAT	160	320	160	80	160	640	640	640	NT	NT
		DTT-MAT	<20	<20	<20	<20	<20	160	320	320	NT	NT
		IgG-ELISA*1	0.02(-)	NT	NT	NT	NT	0.78(+)	0.83(+)	0.81(+)	NT	NT
		IgA-ELISA*2	0.06(-)	NT	NT	NT	NT	0.64(+)	0.57(+)	0.36(+)	NT	NT
	R (平成 24年 5月 22日)	MAT	640	320	320	160	160	160	160	160	320	320
		DTT-MAT	40	40	40	20	20	<20	<20	<20	80	160
		IgG-ELISA	0.30(+)	0.27(+)	0.24(+)	0.20(+)	0.17(+)	NT	NT	NT	NT	NT
		IgA-ELISA	0.65(+)	0.46(+)	0.25(+)	0.14(-)	0.12(-)	NT	NT	NT	NT	NT
	S (平成 18年 4月 8日)	MAT	160	320	160	160	160	160	160	160	160	80
		DTT-MAT	<20	20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20	20
		IgG-ELISA	0.05(-)	0.07(-)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
		IgA-ELISA	0.24(+)	0.57(+)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
T (平成 22年 4月 30日)	MAT	160	320	160	80	160	160	160	160	160	160	
	DTT-MAT	<20	<20	<20	<20	40	<20	<20	<20	<20	20	
	IgG-ELISA	0.06(-)	NT	NT	NT	0.51(+)	NT	NT	NT	NT	NT	
	IgA-ELISA	0.22(-)	NT	NT	NT	0.24(+)	NT	NT	NT	NT	NT	
種雄馬 (n=1)	U (平成 17年 2月 20日)	MAT	160	160	160	160	160	160	160	160	NT	320
		DTT-MAT	40	40	80	40	40	40	80	40	NT	80
		IgG-ELISA	0.58(+)	NT	NT	NT	0.61(+)	NT	NT	NT	NT	NT
		IgA-ELISA	0.15(-)	NT	NT	NT	0.15(-)	NT	NT	NT	NT	NT

\*1, 2: 数値は ELISA 値, ( ) 内は判定を示す

1月14, 15日採材)がIgAのみ陽性であった。

DTT-MAT凝集価が陽性と判定された馬の割合は、発生時の12.5% (2/16) から、約3カ月後の42.1% (8/19) と上昇した。なお、同居馬10頭 (I~N, P, S, T, U) 32検体の生殖器スワブ並びに病理解剖に供した1頭 (Q) の各検体から本菌は分離されなかった。

発生地域馬群における DTT-MAT 凝集価が陽性と判定された馬の LPS-ELISA 成績を表4に示す。DTT-MAT 凝集価が陽性と判定された馬は28頭, 4.5% (28/619) であり, LPS-ELISA において IgG と IgA のどちらか一方または両方が検出された。なお, このうち3頭 (No. 10, 14, 21) は, MAT 凝集価が疑陽性または陽性と判定された。

非発生地域馬群では, MAT 凝集価の判定はすべての馬が陰性であり, DTT-MAT 凝集価の判定では供試した803頭中1頭を除きすべてが陰性となった。DTT-MAT 凝集価の判定が陽性となった馬は, LPS-ELISA において IgG は陰性 (OD=0.04), IgA が陽性 (OD=0.34) の判定となった。

非発生地域馬群と発生地域馬群及び発生馬群 (平成26年1月14, 15日採材) における DTT-MAT 凝集価が陽性と判定された馬の割合は, それぞれ0.1% (1/803), 4.5% (28/619), 29.2% (7/24) であり,

Fisher の正確確率検定の結果, いずれの群の間においても有意差を認めなかった (非発生地域馬群と発生馬群:  $P=1.6 \times 10^{-10}$ , 非発生地域馬群と発生地域馬群:  $P=1.4 \times 10^{-9}$ , 発生馬群と発生地域馬群:  $P=1.4 \times 10^{-4}$ )。また, DTT-MAT 凝集価の判定と LPS-ELISA の判定の間のコーエンのカッパ係数は0.693であり, かなり良い一致度であった [8]。

## 考 察

今回, われわれは, 馬パラチフス血清学的検査の特異性を高めるため, DTT 処理血清による MAT を実施し, その有用性について検討した。DTT-MAT 凝集価が陽性と判定された64検体は, 1検体を除きすべてで LPS-ELISA において IgG と IgA のどちらか一方または両方が検出された。また, DTT-MAT 凝集価の判定と LPS-ELISA の判定との間には, かなり良い一致度が得られた。これより, DTT-MAT は本菌の LPS に対する IgG または IgA を検出していると推察された。

DTT-MAT の感度について, 発生馬群の異常産馬8頭はいずれも菌分離陽性で, DTT-MAT 凝集価の判定も陽性であったことから, DTT-MAT は, 本病発症馬を的確に判定できる方法であると考えられた。さらに, 採材間隔が1~2週間に1回であり詳細には比較できない

表4 発生地域馬群の DTT-MAT 陽性検体と LPS-ELISA 値

個体 No.	DTT-MAT	MAT	IgG-ELISA		IgA-ELISA	
			OD 値	判定	OD 値	判定
1	20	160	0.24	+	0.23	-
2	40	160	0.47	+	0.38	+
3	20	160	0.41	+	0.13	-
4	20	160	0.19	+	0.37	+
5	20	160	0.15	+	0.58	+
6	20	80	0.26	+	0.33	+
7	20	80	0.38	+	0.28	+
8	20	80	0.36	+	0.40	+
9	80	320	0.73	+	0.24	+
10	80	640	0.58	+	0.29	+
11	40	320	0.31	+	0.56	+
12	20	80	0.36	+	0.37	+
13	20	320	0.33	+	0.20	-
14*	80	1,280	0.73	+	0.92	+
15	20	160	0.15	+	0.51	+
16	20	160	0.22	+	0.59	+
17	20	160	0.36	+	0.57	+
18	80	160	0.71	+	0.60	+
19	20	160	0.47	+	0.28	+
20	20	80	0.30	+	0.41	+
21	40	640	0.24	+	0.99	+
22	20	320	0.18	+	0.13	-
23	20	160	0.60	+	0.23	-
24	40	80	0.03	-	0.25	+
25	20	320	0.36	+	0.28	+
26	20	320	0.53	+	0.70	+
27	20	160	0.11	-	0.47	+
28	20	160	0.31	+	0.22	-

\* 発生農場と疫学的関連あり

が、抗体が検出され始める時期は、MAT と DTT-MAT ではほぼ同時期であった一方、MAT が感染後の時間経過によって陰転した後も、DTT-MAT により DTT 耐性抗体が検出され続けた。これより、DTT-MAT は、MAT よりも長期に本病の感染歴を検出できる方法と考えられた。本病では感染馬の一部が保菌馬となり、長期間にわたり保菌することが報告されている [9, 10]。MAT よりも感染歴の有無を長期間にわたり検出できる DTT-MAT は、保菌の可能性のある馬を特定し、本病の新たな発生の予防に活用できる方法と考えられた。

また、発生馬群の無症状同居馬では、本菌は分離されず、MAT 凝集価において陽性と判定される馬は認められなかったが、発生から約3カ月後には DTT-MAT 凝集価が陽性と判定される馬の割合が上昇した。当該農場では異常産発生時にさまざまな農場環境から本菌が検出されており（未掲載データ）、DTT 耐性抗体は、本菌の軽度な感染により産生された抗体であると考えられた。DTT-MAT は、本菌の汚染状況を把握するうえでも有用であると考えられた。

DTT-MAT の特異性について、これまでに本病の発生例が報告されていない非発生地域馬群と発生農場周辺の発生地域馬群における DTT-MAT 凝集価が陽性と判定された馬の割合は、0.1%、4.5%であった。非発生地域馬群の1頭は北海道で生産されていたが、生産地区は本病発生農場と異なっており、発生地域馬群の28頭については、1頭を除き疫学的関連は不明であった。これら29頭について LPS-ELISA を実施した結果、本菌感染馬と同様に本菌を含む菌体（O4）抗原に対する IgG、IgA のどちらか一方または両方が検出された。これらの馬については、臨床症状を認めないレベルでの本菌の感染や、他の O4 群 *Salmonella* 属菌の感染が起こっていた可能性が考えられた。本菌と他の O4 群 *Salmonella* 属菌は、菌体抗原は共通であるものの、鞭毛抗原には相違があることから、識別には鞭毛に対する抗体についても検討する必要があると考えられた。

また、MAT 凝集価が疑陽性と判定された検体において、DTT-MAT 凝集価が陰性と判定される検体（I：平成26年1月14、15日採材）が認められた。当該馬は、無症状であり十分な抗原刺激を伴う感染ではなかった可能性があるとともに、本病発生時に採取された血清であったことから、抗体の主体が IgM であった可能性が考えられた。

本研究では、検出限界である凝集価20倍以上を DTT 耐性抗体が存在すると考え、DTT-MAT の陽性基準とした。発生馬群と非発生地域馬群において、DTT-MAT で陽性と判定される値を示す割合を比較した結果、有意差を認めたことから、DTT-MAT の陽性基準を20倍とすることは妥当と考える。しかし、発生馬群の同居馬において、DTT-MAT 凝集価が20倍未満にもかかわらず、IgG または IgA-ELISA が陽性と判定される検体が確認されており、DTT-MAT の陽性基準については、さらなる検討が必要と考える。

以上より、DTT-MAT は MAT と比較し、より鋭敏に感染抗体である IgG または IgA を検出できる点、及び LPS-ELISA と比較し、特別な資材を必要としない点で有用であると考えられた。しかし、一部で本病とは疫学的に関連のない馬においても DTT 耐性抗体が検出されている点や、感染初期抗体である IgM が不活化された可能性がある馬が確認された点を考慮すると、現行の公定法である MAT も有用であると考えられる。MAT と DTT-MAT を併用することにより血清学的検査の特異性を向上させるとともに、検査成績と疫学情報を考慮して、本病の病態を総合的に判断することが必要と考えられた。

最後に、検体の採材にご協力いただいた方々に深謝する。

引用文献

- [1] 安齊 了：馬パラチフス，動物の感染症，明石博臣編，第3版，169，近代出版，東京（2011）
- [2] 安齊 了，鎌田正信，中村政幸，山本孝史，伊佐山康郎：馬パラチフス試験管凝集反応法の改良，日獣会誌，48，945-948（1995）
- [3] 丹羽秀和，木原博文，永井英貴，秋庭正人，國保健浩，加藤一典，安齊 了，高井伸二：馬パラチフスの血清診断のためのマイクロ凝集反応法，日獣会誌，72，210-214（2019）
- [4] Grönwall C, Vas J, Silverman GJ : Protective roles of natural IgM antibodies, *Front Immunol*, 3, 66 (2012)
- [5] Okuno T, Kondelis N : Evaluation of dithiothreitol (DTT) for inactivation of IgM antibodies, *J Clin Pathol*, 31, 1152-1155 (1978)
- [6] Pabuccuoglu O, Ecemis T, El S, Coskun A, Akcali S, Sanlidag T : Evaluation of serological tests for diagnosis of brucellosis, *Jpn J Infect Dis*, 64, 272-276 (2011)
- [7] Gall D, Nielsen K, Bermudez RM, Muñoz del Real MC, Halbert G, Groulx R, Moreno F, Chow EY, Checkley SL : Development of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detecting equine serum antibodies to the lipopolysaccharide of *Salmonella abortusequi*, *Res Vet Sci*, 81, 215-217 (2006)
- [8] 山根逸郎：診断の評価，獣医学実用ハンドブック，第1版，29-46，チクサン出版社，東京（2005）
- [9] 青木貞治，久米常夫，海老洋一，三島権一：馬パラチフス症馬の体内菌分布状態と補助診断としての胸骨穿刺について，日獣会誌，6，391-395（1953）
- [10] Niwa H, Hobo S, Kinoshita Y, Muranaka M, Ochi A, Ueno T, Oku K, Hariu K, Katayama Y : Aneurysm of the cranial mesenteric artery as a site of carriage of *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abortusequi in the horse, *J Vet Diagn Invest*, 28, 440-444 (2016)

The Utility of the Microplate Agglutination Test Using Dithiothreitol in a Serological Test for Equine Paratyphoid

Hiroyasu TAKAHASHI<sup>1)†</sup>, Hidekazu NIWA<sup>2)</sup>, Azusa YAGI<sup>3)</sup>, Kiyoko NOBUMOTO<sup>1)</sup>, Yoshinari KATAYAMA<sup>2)</sup>, Yoshikazu MATSUDA<sup>4)</sup>, Satoshi TACHIBANA<sup>1)</sup> and Toru ANZAI<sup>5)</sup>

- 1) *Hokkaido Tokachi Livestock Hygiene Service Center, 59-6 Kisen, Kawanishi, Obihiro, 089-1182, Japan*
- 2) *Epizootic Research Center, Equine Research Institute, Japan Racing Association, 1400-4 Shiba, Shimotsuke, 329-0412, Japan*
- 3) *Department of Agriculture, Hokkaido, Government, Nishi 6, Kita 3, Chuoh-ku, Sapporo, 060-0003, Japan*
- 4) *Japan Racing Association, 1-1-19 Nishi-shinbashi, Minato-ku, 105-0003, Japan*
- 5) *Laboratory of Racing Chemistry, 1731-2 Tsurutamachi, Utsunomiya, 320-0851, Japan*

SUMMARY

We investigated the antibody response to the *Salmonella* O4 antigen using the microplate agglutination test (MAT) and MAT combined with dithiothreitol (DTT) treatment using serum samples sequentially obtained from horses with equine paratyphoid, apparently healthy horses kept in the same stable, horses kept on farms near the farm that raised *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Abortusequi-infected horses, and horses kept in a non-endemic area of equine paratyphoid. DTT-MAT titers of samples collected from all symptomatic horses were tentatively positive (1:20 or more) and were maintained for a long time although those in MAT were negative (less than 1:320). In DTT-MAT, antibodies of the O4 antigen were detected in 8 of 15 (42.1%) serum samples collected from apparently healthy horses kept in the same stable. The antibody-positive rate of DTT-MAT in horses kept on farms near the farm where *S. Abortusequi*-infected horses were raised and horses kept in a non-endemic area of equine paratyphoid were 4.5% and 0.1%, respectively. The presence of IgG or IgA antibody against *S. Abortusequi* LPS in ELISA were confirmed in almost all DTT-MAT-positive sera. DTT-MAT would be useful in the serological diagnosis of equine paratyphoid because of its prolonged ability to detect a specific antibody against the somatic antigen produced by an *S. Abortusequi* infection.

— Key words : Dithiothreitol treatment, Equine paratyphoid, Microplate agglutination test, O4 antigen.

† Correspondence to (Present address) : Hiroyasu TAKAHASHI (Hokkaido Abashiri Livestock Hygiene Service Center) 323-5 Taisho, Kitami, 090-0008, Japan  
TEL 0157-36-0725 FAX 0157-36-5801  
E-mail : takahashi.hiroyasu@pref.hokkaido.lg.jp

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 72, 601~607 (2019)