

# 14. NAD 非添加で発育する *Mycoplasma synoviae* (MS) 株を用いた赤血球凝集阻止法 (HI 法)

豊後大野家畜保健衛生所

○加藤洋平・(病鑑) 長岡健朗・(病鑑) 河上友・丸山信明

## 【はじめに】

鶏のマイコプラズマ (以下、マイコ) の検査法として急速平板凝集法 (以下、RSA) による抗体検査が一般的に行われている。RSA は簡便で迅速な反面、様々な原因による非特異反応で、陽性・陰性の区別が不明瞭な場合がある。抗体検査法には HI 試験もあるが、MS には HI 試験に利用可能な高い HA 価の株がなく、方法が確立されていない。

当家保でも、2020 年 4 月に種鶏 A 農場の衛生検査で MS の微弱な凝集を認めた事例があったが、判別がつかなかったため、感染の有無を確認するため追加採材した気管スワブでの PCR 検査を実施した結果、陰性を確認し、凝集は非特異反応であると間接的に判断した。

しかし、検体や検出対象が異なる PCR で判断することは適切ではないと考えられたことから、今後、同様の非特異反応が発生した場合に備えて、RSA に変わる血清を用いた特異性の高い抗体検査方法として、MS 株を用いた HI 法を検討したので報告する。

## 【1 HI 法の HA 素とするための MS 株の分離】

B, C, D の 3 農場 (表 1) より採取した気管スワブ 50 検体の PBS 洗い出し液を遠心分離し、その上清を Frey 培地に接種培養した。

コンタミネーション (以下コンタミ) がなく、発育による pH 低下で色調変化が見られたものを、0.45 マイクロメートルフィルターで濾過を行った後に新たな培地に継代し、さらに色調変化が見られたものをマイコ分離陽性とした。分離マイコについては PCR 法で同定を行った (図 1)。

分離された MS の NAD 要求性を調べるため、NAD 含有培地 (以下 Complete 培地)、NAD 非含

採材農場	採材日	検体数
B農場 採卵鶏(10,000羽)	R2.8.6	10検体
	R2.9.8	10検体
C農場 採卵鶏(45,000羽)	R2.8.7	30検体
D農場 特用鶏(1,300羽)	R2.8.25	10検体

表1. MSの分離 検体採材農場



有培地（以下 Incomplete 培地）での発育を比較した（培地の組成は表 2 を参照）。赤字で示したイーストエキスと NAD シス테인混合物は NAD 源であり、Incomplete 培地には添加していない。ただし、非動化豚血清についても NAD 源となる可能性はある。

分離の結果、B からは *Mycoplasma gallisepticum* (以下 MG) 1 検体、MS6 検体、不明 3 検体が分離された。また C からはそれぞれ、1 検体、25 検体、2 検体が分離され、D からは不明 5 検体が分離された。MG、MS はマイコ特有のコロニーの形成が確認されたが、D ではコロニーは形成されなかった（図 2）。

分離されたマイコのうち、MS について性状を比較した。表 3 は、各株を Complete 培地、Incomplete 培地に接種した際の培地の色調変化に要した日数と HA 価を示している。（表の赤いマスが HA (+)、黄色のマスが HA (±)、青いマスが HA (-)）。

また、検体 No. が赤い株は Incomplete で発育した株を示している。B 由来株は Complete でのみ発育したが、C 由来株は Incomplete でも発育する株はあった。

### 【2 高い HA 価を得るための培養条件の検討】

C から分離された MS 8 株について Complete 培地・Incomplete 培地の 2 種の培地に接種して色調変化発現まで培養したものをマスターシードとした。さらにそれぞれを 2 種の培地へ 10 倍量に接種し、24 時間培養したものをワーキングシードとし 0.75 ml ずつ保存した（図 4）。

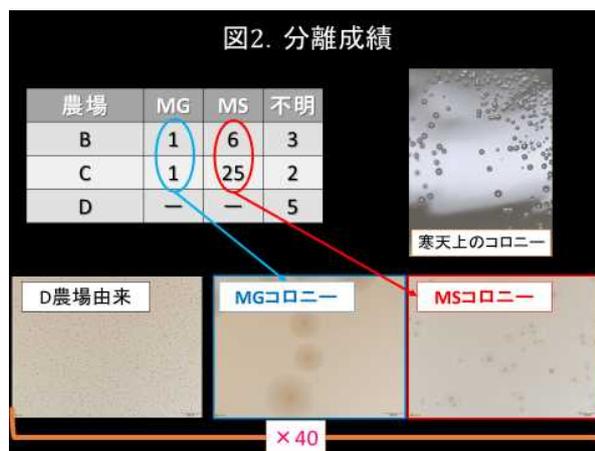
ワーキングシードを Complete 培地・Incomplete 培地に 1 : 40 の比率で接種培養して、8 時間毎の HA 価の推移を比較した。図 5 は Complete 培地、図 6 は Incomplete 培地での培養結果であり、縦軸は HA 価、横軸は培養時間、折れ線は時間経過後との HA 価の変化を示している。また、各グラフの上の写真は時間経過での培地の色調変化で、

分離されたMSのNAD要求性を調べるため、2種類のFrey培地 (Complete培地、Incomplete培地と呼称) での発育を比較。

Complete: NAD (+)    Incomplete: NAD (-)

培地添加物 (赤字: NAD含有)	NAD (+) Frey Complete 培地	NAD (-) Frey Incomplete培地
Frey培地 broth	2.25g	
50%グルコース液	2ml	
0.6%フェノールレッド	2.5ml	
イーストエキス	2ml	—
非動化(56°C30分)血清 (※) NAD源となる可能性あり		12ml
アンピシリン(50µg/ml)	0.25ml	
5%酢酸タリウム	0.5ml	
NADシス테인混合物	2ml	—
精製水	80.75ml	

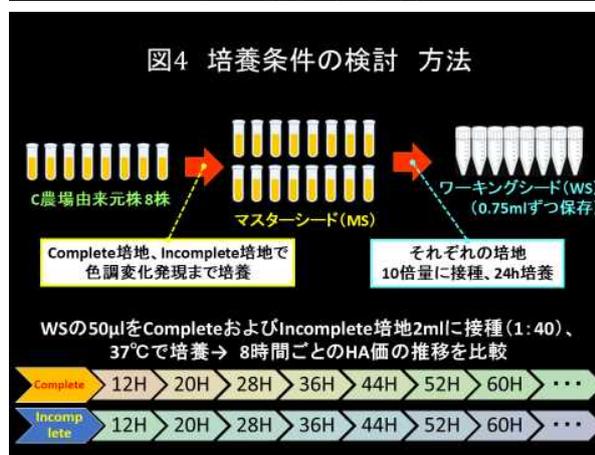
表2. MSの分離培地



農場	検体 No.	培地	色調変化に要した日数						HA価						
			4	8	16	32	64	128	4	8	16	32	64	128	
B	50	C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		I	>6												
	54	C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
		I	>6												
	C	2	C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
			I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3		C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
		I	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
4		C	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
		I	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
6		C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
		I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
7		C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
		I	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
8		C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
		I	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
9		C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
		I	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
13		C	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
		I	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
14		C	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	
		I	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	
15	C	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		
	I	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4		

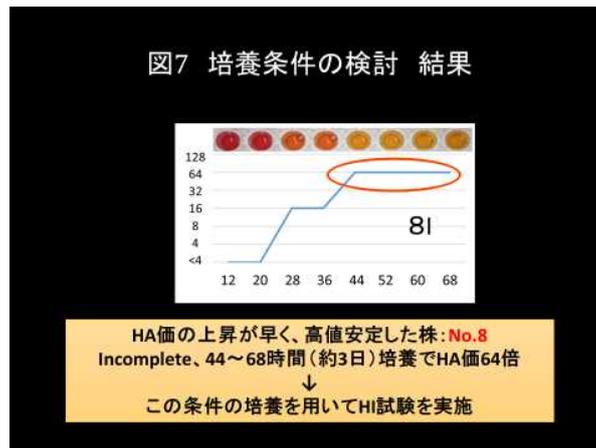
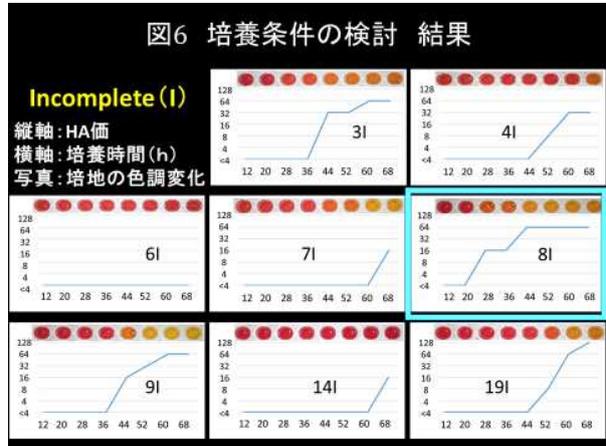
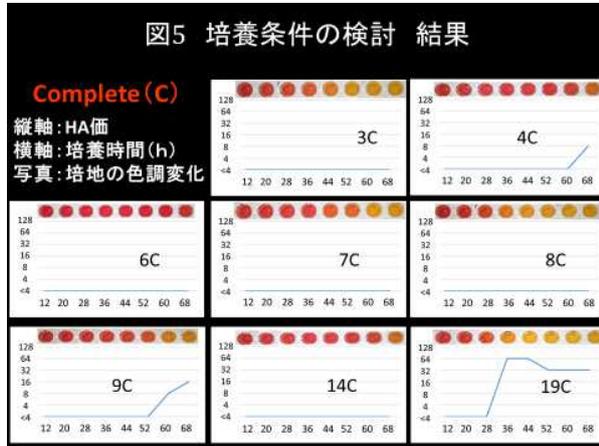
赤字NO.: Incompleteでも発育した株  
※③ HA試験 判定基準

表3. 分離MS性状比較



マイコ発育前は赤色、発育するに従って黄色に変化した。

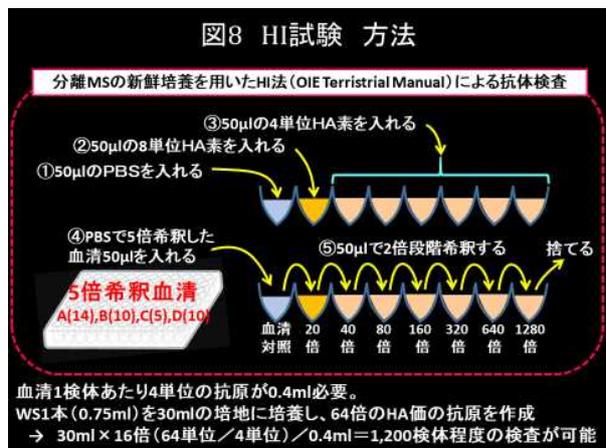
Complete 培地よりも Incomplete 培地において HA 価の高い株が多く確認された。特に、HA 価の上昇が早く、高値で安定していた No. 8 は、Incomplete 培地で、44~68 時間にわたって HA 価 64 倍を維持することが確認された。この株と培養条件を用いて HI 試験を実施した (図 7)。



### 【3 HI 試験】

A~D の 4 農場由来の血清それぞれ 14、10、5、10 検体について、分離 MS の新鮮培養を用いた HI 法を実施した。その方法を図 8 に示した。

この方法では血清 1 検体あたり 4 単位の抗原が 0.4ml 必要であり、WS0.75ml を 30ml の培地に接種し 48 時間培養したところ、64 倍の HA 価の抗原を作成することができた(※)。また、同時に RSA も実施した。RSA では非特異反応の抑制のため、馬血清添加と非添加を比較した。図 9 に示すように、添加の有無にかかわらず、A は微弱な凝集、B、C は顕著な凝集が見られ、D は非凝集であった。陽性率は A、B、C は全て陽性、D は全て陰性だった。



いっぽう、HI 試験では図 10 の 96 穴プレート図のように、管底が日の丸状を呈するものを陽性、管底に一様に広がっているものを陰性とした。A, D はすべて陰性、B, C はすべて陽性だった。抗体価 (GMT 値) は A, D が 20 未満、B が 183.8、C は 100.8 だった。A は RSA では結果が不明瞭だったが、HI 試験により陰性と明確に判定が可能であった。



(※) HI 試験に実際に必要な HA 価は 4 単位であり、16 倍希釈すると約 480ml の抗原液を得ることができた。1 検体あたり必要な高原駅は 0.4ml であるため、WS 一本では 1,200 検体程度の検査が可能な計算となる。

**【考察】**

MS の培養には一般的に NAD が必須で、培養には還元させた NAD シス테인混合物を添加する。今回 C から分離された株の中には NAD 源未添加で発育可能であり、また 64 倍と高い HA 価を安定して示すものも見られた。また、その株は約 3 日と比較的短時間で HI 試験に供することができ、結果も良好であった。

これらの結果から、今回分離された株は培養が容易であり、HI 試験のための HA 素としても好適と考えられた。

また、今回分離された MS を用いた HI 試験では、RSA で陽性と非特異反応の判別が不明瞭であった検体について、明確な判定が可能であることが確認できた。これらの結果から、今後、RSA で非特異反応が疑われる場合は本法を用いた確認検査が有効であると思われる。