

酵素抗体法 (ELISA) による 豚の肝白斑症診断の試み

佐伯英治 須崎 聰 清明広 高橋 強 石井俊雄

(掲載決定: 平成3年7月24日)

要 約

オガクズ豚舎で多発する肝白斑症の発生状況を把握することを目的に, ELISA 法の基本反応条件を検討した。比較試験の結果, 抗原としては, 豚回虫 *Ascaris suum* 雌成虫体壁を炭酸緩衝液で抽出したものが選択された。発色剤として ABTS を用い, 豚回虫非感染豚由来血清の OD 値から陽性限界値を算出したところ, 0.150 という値が得られた。さらに, 豚回虫実験感染豚の OD 値は, 全て陽性域にあったことから, 本法の実用性が確認された。

続いて, 群馬県下のオガクズ養豚農場を対象に, 野外調査を実施した。その結果, 屠殺解体時にそれぞれ28, および22%というかなり高い肝白斑陽性率を示した2つの豚舎では, 試験対象豚の ELISA 抗体陽性率が導入時から3ヶ月経過した時点で, それぞれ19%から52%, および30%から60%と明らかに上昇し, この間における新たな感染が示唆された。また, 両群の平均 OD 値も0.109 から0.162, および0.142から0.188といずれも陽性域に上昇していた。

以上の成績から, ELISA 抗体陽性率と OD 値の推移を観察することで, 肝白斑症の発現傾向をある程度推測できるものと考えられた。

Key words : *Ascaris suum*, milk spot, saw dust litter, ELISA, ABTS

緒 言

オガクズは比較的安価で, しかも糞尿の水分吸収, 護蹄あるいは保温性などにすぐれているため, 家畜の敷料として広く利用されている。とくに, 敷料さらには飼料中にも発酵菌, 酵母などを加え, 糞尿の発酵分解と脱臭を企てる方式を“発酵オガクズ豚舎方式”といい, これは糞尿を数ヶ月間以上の長期にわたり排除する必要のない独特の養豚方式で, 環境保全や省力化と言う面での評価は高く, 全国規模で普及している(手塚・平, 1986)。ところが, ひとたび寄生虫が侵入すると, 虫卵やオーシストなどが長期間蓄積され, 従来的一般豚舎に比べて重度な感染をひき起す可能性が秘められているため, 肝白斑症(藤田ら, 1985), 急性豚鞭虫症(藤原ら, 1985; 平・池田, 1985; 平・手塚, 1985)あるいはトキソプラズマ症(北野, 1982)等の発生があり, 衛生管理上問題となっていることも事実である。

著者らはすでに, 抗豚回虫抗体検出に豚回虫雌成虫抗原を用いた ELISA 法を開発し, これを報告した(古谷ら, 1986)。一方, これに並行して発酵オガクズ豚舎に多発する肝白斑症の検出に主眼を置き, とくに野外にお

いても簡便に応用し得る ELISA 法を開発すべく ABTS (2, 2'-azino-di- [3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid (6)]) の取扱い上の利点に着目し, これを発色剤とした ELISA 法についても検討してきた。そしてこの実用性を認めた上で, 本法を用いて群馬県下の一オガクズ養豚農場を対象とした野外応用試験を実施し, 肉豚育成過程における抗豚回虫抗体検出の意義について考察を加えた。

材料と方法

(1) ELISA 法の基本反応条件の設定

抗原作製法: 埼玉県大宮食肉衛生検査所で採取した豚回虫虫体を, 生理食塩水でよく洗滌し, 雌雄別に, さらにそれぞれを体壁(角皮, 角皮下層, 筋層および側索などを含む)と内臓に分けた(以下, それぞれ雌体壁, 雌内臓, および雄体壁, 雄内臓抗原と省略する)。続いて, 滅菌生理食塩水, 蒸溜水の順で再び洗滌し, 凍結乾燥した。これらの凍結乾燥虫体を乳鉢で磨砕し, 粉末200mgにつき0.05M炭酸緩衝液(pH9.6)を10ml加えホモジナイズした。この乳剤を凍結用アンプルにとり, -79°C(10分)および37°C(4分)の凍結融解を10回繰返し, さらに炭酸緩衝液を適量加えて4°Cで48時間抽出した。抽出終了後, 20,000G, 60分間遠心し, その上清を抗原

として供試した。蛋白量は、ローリー法 (Lowry *et al.*, 1958) で測定した。

抗原濃度の調整: 抗原の至適蛋白濃度を決定する目的で、既述の4種抗原とこれらをそれぞれ当量混合した抗原 (以下混合抗原) の計5種抗原について、0.05M炭酸緩衝液で蛋白濃度として0.1, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 50.0および100.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の7段階に希釈し、プレート1穴当たり50 μl ずつ滴下した。

陽性血清および陰性血清: 豚回虫成熟卵10,000個を30日間連続投与し、最終投与7日後に得た実験感染豚由来の血清8例と、同じく豚鞭虫成熟卵70,000個投与7週後の血清6例 (いずれもファイザー製薬株式会社農産技術センターより分与を受けた) をそれぞれの陽性血清とした。さらに、SPF豚あるいは糞便検査と剖検により虫体の有無、および病変の如何を精査し、回虫陰性を確認した個体由来の血清27例を陰性血清として供試した。これらの血清を、1%の割合に牛血清アルブミン (BSA) を加えた0.05% Tween 20加リン酸緩衝液 (1%BSA加PBS) で、それぞれ100, 200, および400倍に希釈してプレート1穴当たり50 μl ずつ滴下した。

二次 (標識) 血清: ペルオキシダーゼ標識抗豚 IgG ウサギ血清 (カッセル社) を、1%BSA加PBSで5,000~8,000倍に2倍階段希釈して、プレート1穴当たり25 μl ずつ滴下した。

基質液: 0.1Mクエン酸-0.1Mリン酸2ナトリウム緩衝液50mlに対し、ABTS (ベーリンガー・マンハイム社) を15mg溶解せしめ、更に30% H_2O_2 を5 μl 加え、プレート1穴当たり200 μl ずつ滴下した。

ELISA 術式: プレートはポリスチレン製マイクロプレート (ダイナテック社, M29ART) を用い、Matsuda *et al.* (1984) の報告に準拠して実施した。各抗原と一次血清の反応時間を37°Cで45分間とし、二次血清および基質液についてはそれぞれ37°Cおよび室温で60分間反応せしめた。

(2) 野外応用試験

試験対象農場: 群馬県下の一オガクズ養豚農場を試験対象農場とした。本農場では、生後約90日齢、体重約30~50kgの育成豚をオガクズ豚舎に導入し、その後約90日間飼育して出荷していた。試験対象の第1~第3豚舎は同一区域に隣接並立し、約200mほど離れて第4豚舎が設置されていた。なお、試験期間は1986年11月より1987年5月までの約6カ月間である。

試験対象豚: 第1~第4豚舎の各63~68頭中17~23頭を無作為に選抜し、導入時から出荷時まで原則的に同一個体について追跡調査した。

検査項目: 導入時から出荷時までの3カ月間にわたり、原則的に月に1度の割合で各豚舎ごとに、それぞれ2あるいは3回の採血と採糞を行ない、同時にオガクズの採

材と体重測定も実施した。血液は教室に持ち返った後、4°Cで一晩放置して血清を分離し、供試した。糞便およびオガクズは4°Cに保存し、可及的速やかにそれぞれオバクター法 (佐伯ら, 1982) およびウィスコンシン変法 (伊東, 1980) で虫卵の検出を試みた。

なお、各回単一の豚舎から出荷したが、屠殺後の肝臓の個体識別は実施できなかった。

成 績

(1) ELISA 法基本反応条件の検討

Fig. 1 は、雌雄体壁および内臓抗原をそれぞれ0.1~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し、豚回虫感染豚血清を100, 200および400倍、さらに二次血清を10,000倍に希釈して反応せしめた成績である。雌雄いずれも内臓抗原では、蛋白量が増量するに伴い、陽性血清のOD値はもちろん、陰性血清のOD値も非特異的に上昇する傾向が示された。

一方、雌雄の体壁抗原を10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の割合で使用した場合、陽性血清希釈200倍におけるOD値は、0.448および0.514といずれもそれぞれの最高値を示した。しかし、200倍希釈陰性血清のOD値は、順に0.034, 0.052という低い値を示すに止どまった。また、成績の詳細は割愛したが、混合抗原では陰性のみならず陽性血清のOD値も他の4種抗原のそれに比較して、若干抑制される傾向が窺われた。従って、以後の検討には常に十分量の抗原を供給可能で、また非特異反応が十分に抑制され、かつ陽性と陰性血清のOD値の差が明らかな雌体壁抗原を、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の割合で使用することとし、被検血清の希釈は200倍に設定した。Fig. 2 は、二次血清の至適希釈倍率に関する実験成績であるが、5,000倍希釈では200倍希釈陰性血清のOD値が0.150を示したのに対して、10,000倍希釈では0.048に止どまり、非特異反応はより十分に抑制されていた。

以上の反応条件で陰性血清27例についてOD値を測定し (Fig. 3), その99%棄却限界値 (Matsuda *et al.*, 1984) を算出したところ0.150という値を得た。陽性血清8例について、同様の条件でOD値を求めたところ、全例が0.150を上回ったことから、この値を陽性限界値として採用した。なお、雌内臓抗原の陽性限界値は0.174と体壁抗原のそれよりもやや高い値を示し、かつ陰性1例はわずかにこの値を上回った。

Fig. 4 は、豚鞭虫実験感染豚由来血清6例と、雌体壁抗原との交差反応性について検討した成績であるが、供試血清全例が陰性域に止まった。

(2) 野外調査成績

Fig. 5 には、第1~第4豚舎の導入時および3か月後のOD値の推移を示した。全ての豚舎において平均

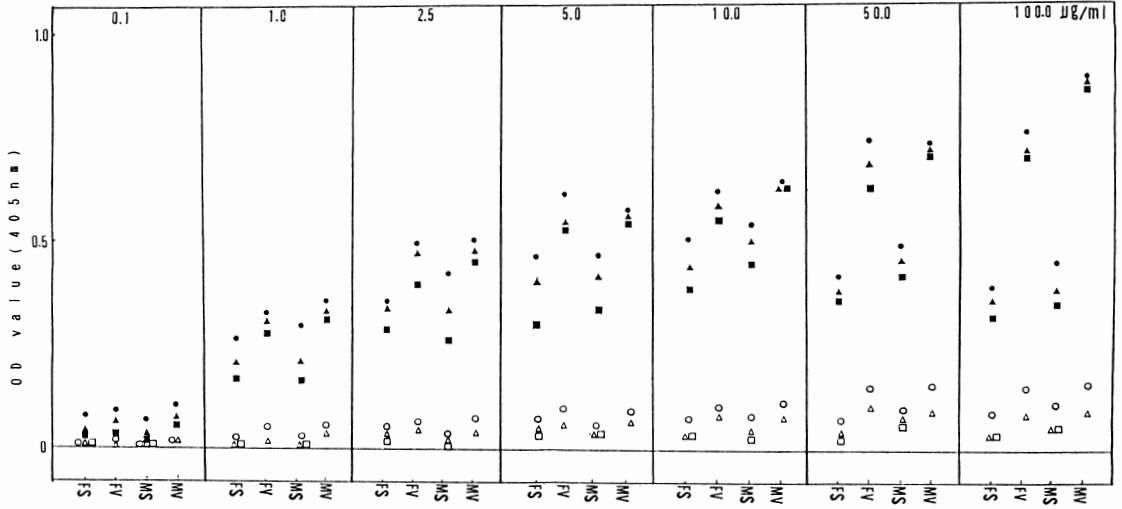


Fig. 1 Effect of antigenic material and protein concentration on sensitivity of ELISA.

*Symbols in Fig. 1.

Origin of swine sera	Dilution at 1:		
	100	200	400
Infected	●	▲	■
Non-infected	○	△	□

**Abbreviated words of antigens in Fig. 1.

	Somatic layer	Viscera
Female	FS	FV
Male	MS	MV

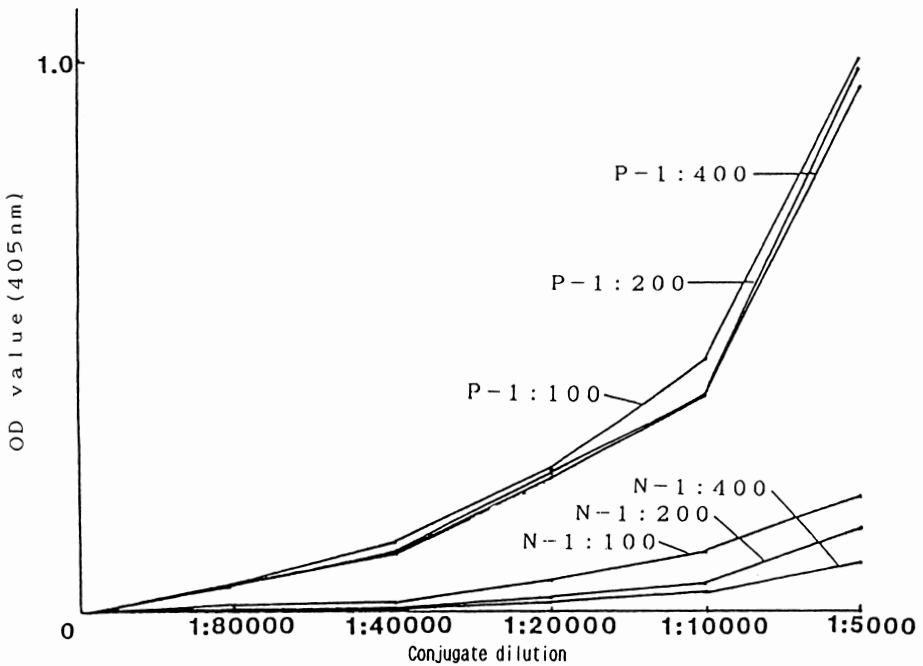


Fig. 2 Comparison of dose-response curves according to conjugate dilutions against positive (P) and negative (N) reference sera diluted at 1:100, 1:200 and 1:400.

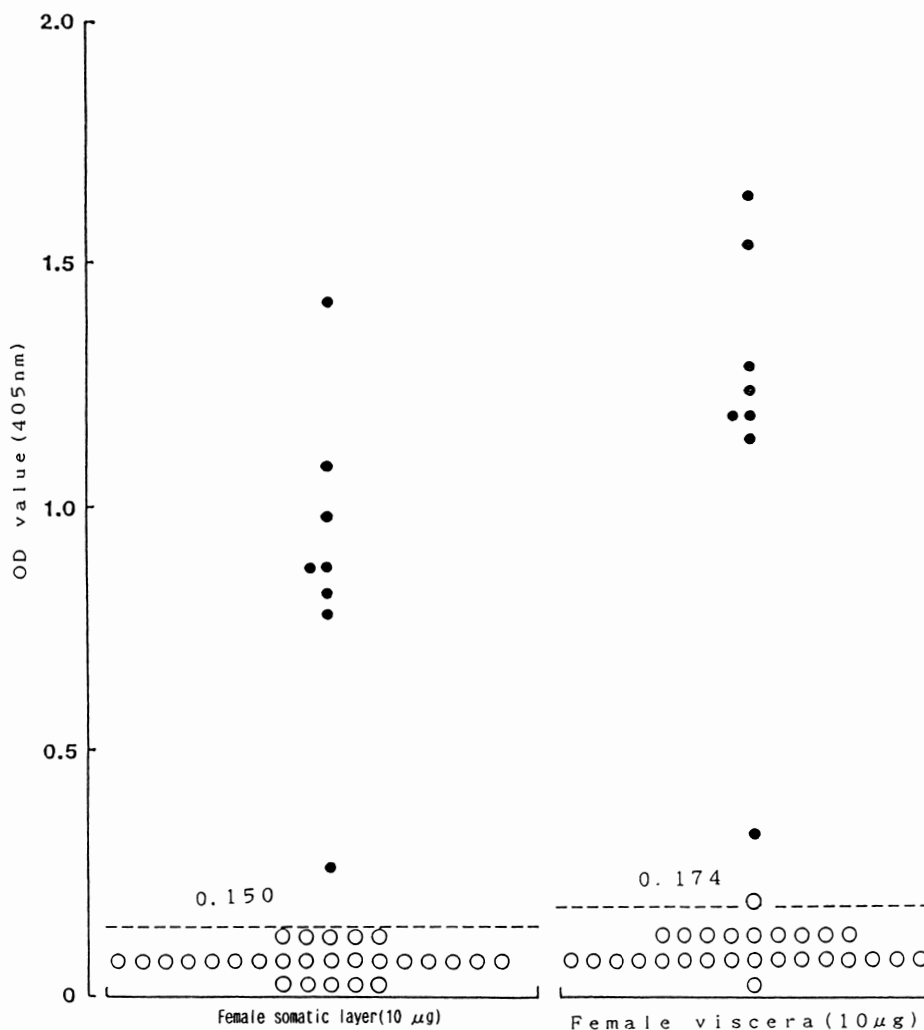


Fig. 3 Distribution of OD values of sera collected from *A. suum* infected (●, n=8) and non-infected (○, n=27) pigs at 1:200 of serum dilution to female *A. suum* somatic layer (left column) and viscera (right column) antigens. Dotted lines represent the detection levels.

OD 値の上昇傾向が窺われたが、特に第3および第4豚舎では陽転した個体が多数認められた。すなわち、第3豚舎では導入時4例 (OD 値 0.157~0.215) が陽性域を示したにすぎなかったが、3ヶ月を経過するとさらに8例が陽転し、合計12例 (0.162~0.357) が陽性を示した。それに伴って平均 OD 値も0.109から0.162に上昇した。また、第4豚舎では陽性例が6例 (OD 値 0.216~0.344) から12例 (0.166~0.273) に増加し、平均 OD 値も0.142から0.188に達した。

Table 1 は、各豚舎ごとの ELISA 陽性数および平均 OD 値、さらにオガクズあるいは糞便からの虫卵検出成績と、食肉衛生検査所における解体検査時の肝白斑陽性

豚数を比較した成績である。第1~第4豚舎の、導入時の ELISA 抗体陽性率はそれぞれ53 (9/17), 11 (2/18), 19 (4/21) および30 (6/20) %であったが、3ヶ月経過した時点では順に53 (9/17), 31 (5/16), 52 (12/23) および60 (12/20) %に達し、第1豚舎を除いていずれも上昇傾向を示した。

各豚舎ごとの屠殺解体時の肝白斑陽性率は順に10 (4/40), 4 (1/23), 28 (5/18) および22 (4/18) %であった。一方、糞便検査では第3豚舎の23頭中の1頭に回虫卵を認める止り、糞便からの虫卵検出率は極めて低かった。また、第1および第4豚舎のオガクズについて、おのおの4回および3回ずつ虫卵検査を行ったところ、

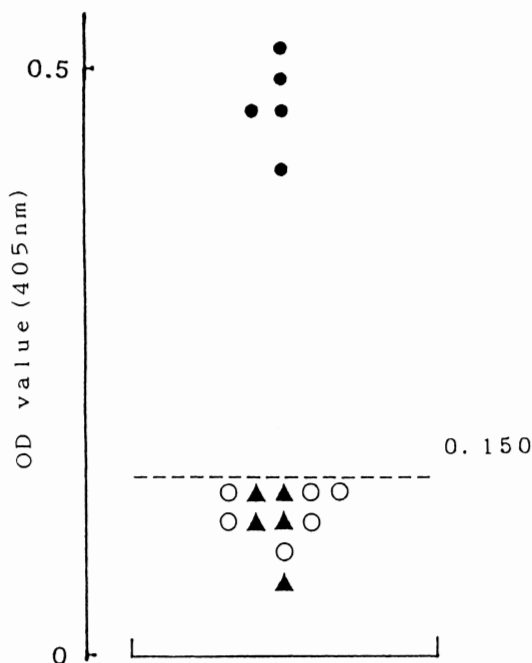


Fig. 4 Cross reactivity of sera collected from pigs experimentally infected with *Trichuris suis* (O, n=6) to female *A. suum* somatic layer antigen. OD values of *A. suum* positive (●, n=5) and negative (▲, n=5) reference sera were also shown.

ともに1度ずつ回虫卵を見出した。しかし、第2および第3豚舎のオガクズからは回虫卵を検出することはできなかった。

考 察

周知のごとく、肝白斑症は肝臓を移行中の豚回虫幼虫に対する宿主のアレルギー反応の結果生ずるものとされている(吉原, 1986)。実験的には50個の豚回虫成熟卵を繰返し投与するか(Eliksen, 1980),あるいは50,000(Yoshihara *et al.*, 1987, 1988)ないし75,000個(羽生ら, 1982)の成熟卵を2~5週間間隔で2~3回感染せしめると、最終投与後1週間以内に肝白斑が必発することが明らかになっている。一方、肝白斑の発現と成虫の腸管寄生とは必ずしも一致せず、むしろ肝臓に病変が認められても成虫が見出されないことが多い(吉原, 1986)。つまり、糞便検査が本症の確定診断になりえない場合が十分考えられる。そのため、特にオガクズ豚舎では、敷料から虫卵を検出することで豚舎の汚染状況を推察する方法が提唱されている(平・手塚, 1985)。一方、体内移行中の幼虫由来抗原に対する抗体を検出する目的で、間接蛍光抗体法(Buchwalder *et al.*, 1981)、ラジオイムノアッセイ(Rhodes *et al.*, 1981)、間接赤血球凝集反応(Eridsen *et al.*, 1980)、サーレス反応(Lejkina, 1965)あるいは、ELISA法(Eriksen, 1982; 古谷ら, 1986)などが検討されている。さらに

Table 1 Results of ELISA, pathological observation of liver lesions and egg examination

Pigpen	ELISA		Mean OD value		No. pigs retaining milk spots/No. of examined (%)	Egg examination	
	No. positive/No. examined(%)		90	180		Saw dust litter	No. of positive Pigs/No. of examined
1	9/17 (53)	9/17 (53)	0.172 (0.071)	0.182 (0.078)	4/40 (10)	+	0/17
			~0.411† ~0.328)				
2	2/18 (11)	5/16 (31)	0.114 (0.057)	0.134 (0.057)	1/23 (4)	-	0/16
			~0.176) ~0.258)				
3	4/21 (19)	12/23 (52)	0.109 (0.044)	0.162 (0.067)	5/18 (28)	-	1/23
			~0.215) ~0.357)				
4	6/20 (30)	12/20 (60)	0.142 (0.061)	0.188 (0.061)	4/18 (22)	+	0/20
			~0.344) ~0.273)				

*: Days of age

†: Range

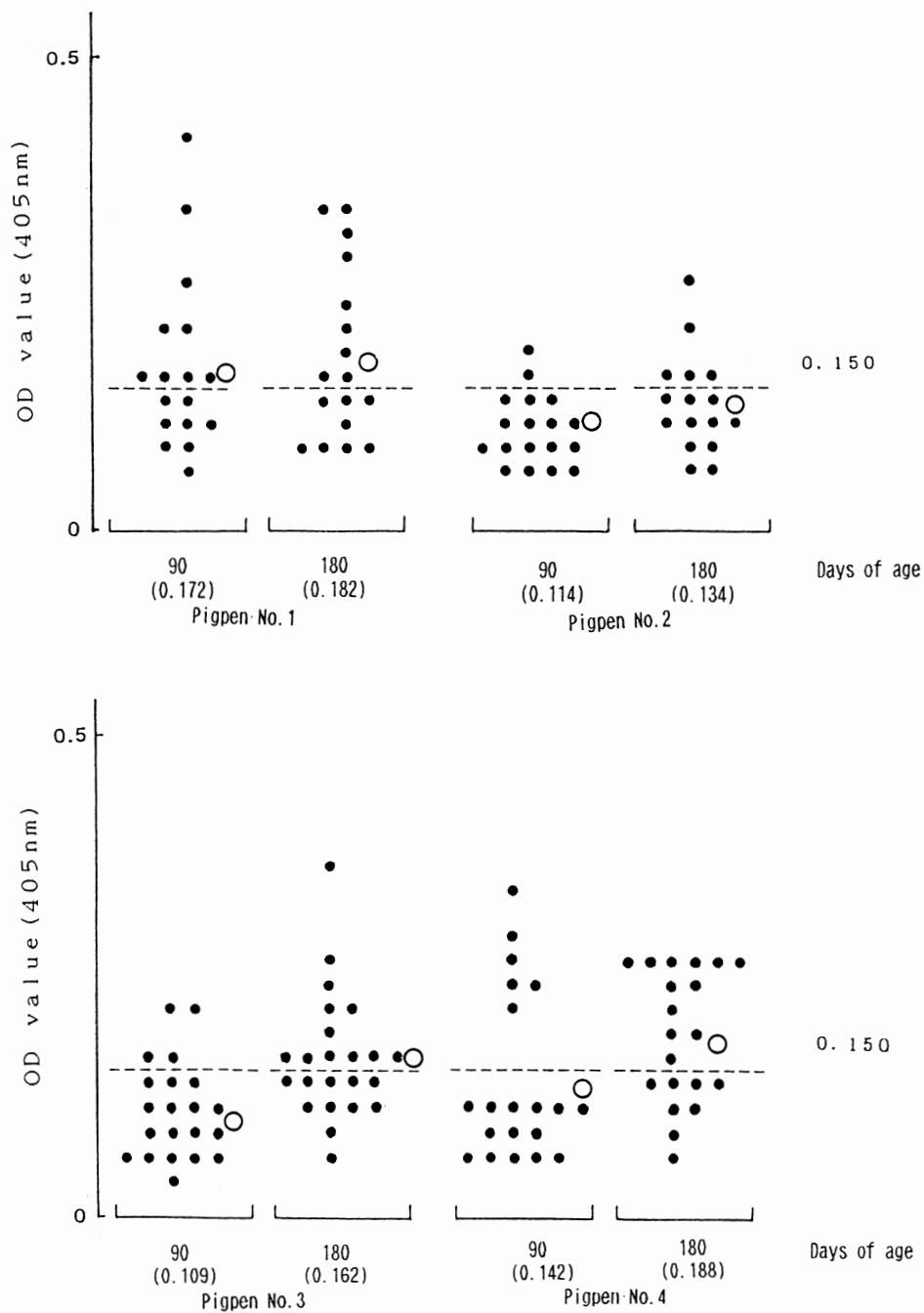


Fig. 5 Changes of OD values in the pigs bred for 3 months in FSD-pigpens. In parentheses mean OD values (○) were shown.

Soulsby (1957) は、野外の肝白斑陽性豚から、皮内反応および沈降反応により抗体を検出したと報告し、また Yoshihara *et al.* も補体結合反応 (1987) あるいは皮内反応 (1988) により、それぞれ肝白斑発症豚155頭中から74例 (48%) および17頭中から13例 (77%) の陽性例を検出したと述べている。

本研究の目的は、オガクズ養豚において衛生管理上重要な問題の一つとなっている肝白斑症の発生状況を、ELISA 法により飼育群単位で推測することにある。そのため、まず操作の過程で、特別な遮光処置を必要としない ABTS を発色剤とした ELISA 法の基本反応条件を再検討した。豚回虫抗体検出のための ELISA 用抗原としては、虫卵や幼虫が多用されてきたが、古谷ら (1986) は、豚回虫雌成虫 VBS 抽出抗原と O-Phenylenediamine による ELISA を実施し、本法がゲル内沈降反応や補体結合反応に比べ、検出感度の点で優れていることを確認している。この成績を踏まえて、予備実験として雌成虫の凍結融解抗原と ABTS を用いた ELISA 法により抗体の検出を試みたが、上述の古谷ら (1986) の報告にあるように、非特異反応を十分抑制することができなかった。そこで、抗原作製法を検討すべく、まず豚回虫成虫を雌雄に分け、さらにそれぞれの体壁および内臓抗原を作製し ELISA 法を実施した。その結果、雌雄内臓抗原では蛋白量の増加に伴い、陽性および陰性血清ともに OD 値の上昇傾向が示された。一方、体壁抗原では蛋白量 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ を境に陽性血清の OD 値はむしろ下降したが、陰性血清の OD 値は低値のまま安定しており、両血清間の OD 値の差は $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ で最も明らかであった。通常、雌虫体は雄よりも大きく、寄生虫体数も多いことに加えて、体壁は同一ロットの抗原を大量に作製することができる点も考慮して、以後の ELISA 用抗原には特異性が高いと思われる雌虫体体壁を使用することとした。そこでこの抗原の蛋白濃度を $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し、被検血清を200倍および二次血清を10,000倍に希釈した場合、陰性対照血清27例の OD 値から得た99%棄却限界値 (Matsuda *et al.*, 1984) は、0.150という十分に低い値を示した。この値を陽性限界値とすると、陰性血清は全例陰性域に止まり、非特異反応はほぼ抑制されたものと考えられた。

ELISA 反応条件を以上の通りに設定し、群馬県下の一貫生産農場を対象に、糞便およびオガクズ検査を並行して行い、豚回虫による汚染程度と肝白斑症発現状況との関連について調査した。当該農場は約2年前にオガクズ豚舎に改造したとのことで、オガクズは原則的には交換せずに不足分を追加する方式をとっていた。事前の調査によれば、常に出荷豚の20~30%に肝白斑を認めていた。豚舎のうち、試験対象の第1~第3豚舎のオガクズは乾燥し、第4豚舎では逆に水捌けが悪く泥ねい状であ

り、いずれも発酵状態は不良であった。各豚舎それぞれ17~21頭ずつの試験対象豚計76頭について、導入時 (90日齢) に OD 値を測定したところ、第1~4豚舎の試験対象豚のそれぞれ、9/17 (53%)、2/18 (11%)、4/21 (19%)、および6/20 (30%) が抗体陽性を示していた。すなわち、オガクズ豚舎導入時にすでに回虫に感染していた可能性が疑われたため、試験対象豚および母豚群それぞれ5頭を無作為に採糞し糞便検査を行ったが、虫卵は全く見出せず原因の特定には至らなかった。しかしながら、特に第1豚舎のごとく、導入時に半数以上が抗体陽性を示した例では、哺育期間中に母豚から感染を受けた同腹個体が存在していたことを示唆するものと思われた。

導入約3か月後の抗体陽性豚数は各豚舎により異なった。すなわち、第1豚舎では新たに陽性を示した個体は認められず、群としての平均 OD 値もほとんど変化なく推移した。第2豚舎では3頭が陽転したが、陽性率自体は31%と最も低く、平均 OD 値は0.134であり、数値としては陰性域に止まった。第3および第4豚舎では、3ヶ月を経過するとそれぞれ8頭および6頭が陽転し、したがって陽性率はそれぞれ19%から52%、および30%から60%と明らかに上昇した。また、平均 OD 値も第3豚舎で0.109から0.162、さらに第4豚舎では0.142から0.188といずれも陽性域に達した。一方、肝白斑の発現率は第3および第4豚舎でそれぞれ28%、および22%と比較的高い値を示したのに対して、第1豚舎では10%、第2豚舎では23頭中1頭 (4%) の肝臓に白斑を認めるに止まった。抗体陽性率も平均 OD 値も低く、かつ糞便およびオガクズともに虫卵陰性であった第2豚舎の肝白斑発現率が低いことは当然予測された。しかし、第1豚舎のように、導入時すでに抗体陽性率や平均 OD 値が比較的高い豚舎で、肝白斑陽性率が10%程度に止まったという事実は、当初の予想に反するものであった。第1豚舎のオガクズからは、回虫卵が検出されているものの、抗体が陽転した個体は全く認められず、その汚染程度は比較的低いものと考えられた。つまり、導入時抗体陽性の一部に、すでに肝白斑が形成されていたと仮定しても、出荷前の一定期間回虫卵の感作をうけることなく経過することによって、肝白斑は軽減あるいは消失した (Copeman and Gaafar, 1972; Eriksen *et al.*, 1980) ののではないかと推察された。

一方、第3および第4豚舎では導入時に抗体陰性だった豚の多くが、ここであらたに豚回虫卵の感作をうけ、その結果両豚舎の抗体陽性率と平均 OD 値が上昇し、結果として肝白斑の発生率も比較的高い値を示したものと思われた。ELISA で得られたこれらの成績と、オガクズあるいは糞便からの虫卵検出成績とは必ずしも一致せず、本症の摘発の難しさがあらためて指摘された。し

かし、上述してきたように、ELISA OD 値を経時的に測定することで、肝白斑症の発生状況を飼育群単位で推測できるものと判断された。また、ELISA OD 値の推移は、単に豚回虫による汚染の程度を意味するだけでなく、回虫と類似の感染様式をもつ他の寄生虫あるいは病原体の侵入の可能性を窺わせることから、オガクズの交換など豚舎の衛生管理上の可及的速やかな対応を促す、一種の指標となるものと思われた。なお、Yoshihara *et al.* (1990) は、豚肺虫が肝白斑症を惹起する可能性を実験的に証明しているが、本報告の試験対象豚については、虫卵および屠殺解体時の肺臓病変のいずれも認められず、その寄生は否定された。一方、糞便検査により豚鞭虫の寄生が確認された試験対象豚が一部存在したが、Fig. 4 に示した如く、体壁抗原と豚鞭虫感染豚由来血清との交差反応性はなく、従って本試験で得られた ELISA の反応特異性は高いものと判断された。しかし、オガクズ豚舎における豚鞭虫の感染は、ときに重度な急性豚鞭虫症を惹起し、育成豚の正常な発育を損なうこともあるので、当該農場のみならずオガクズ養豚農場では十分な衛生対策が望まれる。この問題に関しては別の機会に述べる予定である。

文 献

- 1) Buchwalder, V. R., Matthes, H. F. and Hiepe, T. H. (1981): Untersuchungen zum serologischen Nachweis von experimentellen Spulwurminfektionen-*Ascaris suum*, *Toxocara canis*-beim Schwein mit Hilfe des Indirekten Immunofluoreszenz-Antikorpertest. *Angew. Parasitol.*, 22, 193-199.
- 2) Copeman, D. B. and Gaafar, S. M. (1972): Sequential development of hepatic lesions of ascaridosis in colostrum-deprived pigs. *Aust. Vet. J.*, 48, 263-268.
- 3) Eriksen, L. (1982): Experimentally induced resistance to *Ascaris suum* in pigs. *Nord. Vet. Med.*, 24, 177-187.
- 4) Eriksen, L., Andersen, S., Nielsen, K., Pedersen, A. and Nielsen, J. (1980): Experimental *Ascaris suum* infection in pigs. Serological response, eosinophilia in peripheral blood, occurrence of white spots in the liver and worm recovery from the intestine. *Nord. Vet. Med.*, 32, 233-242.
- 5) 藤田正一郎・坂本一美・松田真紀代・近藤守人・平井洋士・北村徹・井筒重樹・田中浄鏡 (1985): ビニールハウス等を利用した簡易踏込式養豚場に多発する豚の肝白斑の検討. 畜産の研究, 39, 81-83.
- 6) 藤原三男・光畑稔・池田逸夫・平詔亨 (1985): 「醗酵オガクズ豚舎」にみられた急性鞭虫症の発生状況と寄生虫学的検査. 日獣会誌, 38, 231-235.
- 7) 古谷徳治郎・矢野泰臣・原田良昭・佐伯英治・石井俊雄 (1986): ELISA による豚回虫抗体検出のための抗原選択. 第101回日本獣医学会講演要旨集, 112.
- 8) 羽生章・中島勇三・榎島敏男・伊藤米人・大橋昭也・平詔亨・吉原忍・鈴木恭 (1982): 豚回虫実験感染豚における肝臓の白斑 (milk spot) (2) ケージ飼育下での白斑の出現と駆虫薬による予防. 第94回日本獣医学会講演要旨集, 89.
- 9) 伊東季春 (1980): 蔗糖液による牛糞便内線虫卵検査法の検討. 日獣会誌, 33, 424-429.
- 10) 北野良夫 (1982): 醗酵敷料施設の共同肥育養豚場で発生した豚トキソプラズマ症. 畜産の研究, 36, 31-36.
- 11) Lejkina, E. S. (1965): Research on ascariasis immunity and immunodiagnosis. *Bull. WHO*, 32, 699-708.
- 12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- 13) Matsuda, H., Tanaka, H., Bias, B. M., Nosenas, J. S., Tokawa, T. and Ohsawa, S. (1984): Evaluation of ELISA with ABTS, 2-2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline sulfonic acid), as the substrate of peroxidase and its application to diagnosis of schistosomiasis. *Jpn. J. Exp. Med.*, 54, 131-138.
- 14) Rhodes, M. B., Staudinger, L. A. and Hart, R. A. (1981): Indirect solid-phase microradioimmunoassay for detection of *Ascaris suum* antibodies in swine sera. *Am. J. Vet. Res.*, 42, 868-870.
- 15) 佐伯英治・池和憲・樋山正士・石井俊雄 (1982): プラスチック製品を用いた新浮游法について. 獣畜新報, 728, 23-28.
- 16) Soulsby, E. J. L. (1957): Precipitin and intradermal tests in *Ascaris lumbricoides* infection in pigs. *Br. Vet. J.*, 113, 492-498.
- 17) 平詔亨・池田逸夫 (1985): 醗酵オガクズ豚舎における急性豚鞭虫症の発生状況, 診断および予防治療. 家畜診療, 260, 5-17.
- 18) 平詔亨・手塚博愛 (1985): 豚舎のオガクズからの豚鞭虫卵検出方法の検討. 畜産の研究, 39, 1469-1472.
- 19) 手塚博愛・平詔亨 (1986): 体長数ミリの豚鞭虫幼若虫の寄生による醗酵オガクズ豚舎の肥育豚における死亡事故と予防治療の試み. 畜産の研究, 40, 745-748.
- 20) 吉原忍 (1986): 豚の肝白斑症. 日獣会誌, 39, 137-144.
- 21) Yoshihara, S., Nakagawa, M. and Suda, H. (1987): Detection of complement fixation antibody against

- Ascaris suum* antigen in pigs with white spots in the liver. Jpn. J. Vet. Sci., 49, 559–561.
- 22) Yoshihara, S., Nakagawa, M. and Suda, H. (1988): Intradermal test for field survey of white spots in the liver of pigs infected with *Ascaris lumbricoides suum*. Jpn. J. Parasitol., 37, 323–330.
- 23) Yoshihara, S., Nakagawa, M., Suda, H. and Taira, N. (1990): White spots of the liver in pigs experimentally infected with *Metastrongylus apri*. Jpn. J. Parasitol., 39, 365–368.

[Jpn. J. Parasitol., Vol. 40, No. 4, 374–382, August, 1991]

Abstract

APPLICATION OF ELISA FOR FIELD SURVEY OF MILK SPOTS
CAUSED BY *ASCARIS SUUM* INFECTION IN PORKERS

HIDEHARU SAEKI, SATOSHI SUZAKI, AKIHIRO SEI, TSUYOSHI TAKAHASHI AND
TOSHIO ISHII

*Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Animal Science University,
Kyonan-cho, Musashino, Tokyo 180, Japan*

In order to apply the ELISA utilizing ABTS (2,2'-Azino-di-[3-ethyl-benzthiazoline sulfonic acid(6)]) as a substrate for horseradish peroxidase to field survey of milk spots on the liver of commercial porkers bred in the pigpens using fermented saw dust for litter (FSD-pigpen), the reactive conditions were firstly investigated. In comparative studies on practical antigenicities of 4 kinds of *Ascaris suum* antigens, female somatic layer was proved as the most appropriate and also available source material for the ELISA antigen. The upper limit of 99% critical range of the absorbance among negative sera was calculated as 0.150. On the other hand, OD values of all positive reference sera isolated from ascaris-infected pigs were far above this level, so it was evaluated that this ELISA procedure could be utilized for practical use.

Therefore, the follow-up investigations were carried out on the commercial porkers bred in 4 FSD-pigpens in Gumma Prefecture for 3 months by the ELISA and egg examinations, and the official meat inspections were finally carried out at the slaughter house. The results obtained suggest that the incidence of milk spots in a herd of commercial porkers raised in an identical pigpen should be expected by observing the aspect of changes of OD values. That is, the high incidence of milk spots should be detected on the slaughtered porkers of which mean OD values increased from negative to positive range during 3 months of posterior half term of feeding period.