

## マイクロタイター法による抗ブルセラカニス凝集抗体の 検出並びに、溶血による影響の検討

河口雅登<sup>1)†</sup> 齋藤奈美子<sup>1)</sup> 勝川千尋<sup>2)</sup> 相馬武久<sup>1)</sup>

1) マルピー・ライフテック(株) 臨床検査センター (〒563-0011 池田市伏尾町103)

2) 大阪府立公衆衛生研究所細菌課 (〒537-0025 大阪市東成区中道1-3-69)

(2011年4月15日受付・2011年6月24日受理)

### 要 約

現在わが国で抗ブルセラカニス凝集抗体検査として汎用されている、試験管凝集反応 (TA) とマイクロタイター法による凝集反応 (MA) を比較するとともに、非特異凝集の原因の一つといわれているヘモグロビン (HGB) 濃度と非特異凝集との関係を検討した。TAで陰性 (<1:160) であった犬血漿72例はMAでもすべて陰性、陽性46例 (≥1:160) はMAでもすべて陽性であった。そして、両法による凝集価 (log) は高い相関性を示した (R = 0.938)。次にSPF犬9頭の全血を人工的に溶血させた血漿成分をさまざまな溶血度合に希釈し、そのHGB濃度とMAによる凝集価 (log) との関係を検討したところ、両者は高い相関性を示した (R = 0.912)。そして、これら希釈溶血血漿のうち、陽性判定基準の1:160以上を示したもののHGB濃度の最低値は0.5g/dlであった。このことからHGBが非特異凝集の一つの重要な要因であると思われる、溶血サンプル供試時に予め、HGB濃度測定の実用性が示された。

—キーワード：ブルセラカニス、ヘモグロビン濃度、溶血、マイクロタイター法、非特異凝集。

----- 日獣会誌 64, 957~961 (2011)

犬ブルセラ症はブルセラ属に分類されるグラム陰性通性細胞内寄生性の小桿菌であるブルセラカニス (*B. canis*) による、人獣共通感染症である。*B. canis* の犬への感染は通常不顕性であるが、精巣炎、胎盤炎や流産を引き起こす場合があることから特に繁殖場での経済的損失につながるケースも少なくない [1-5]。

本症の診断には菌分離、特異遺伝子の検出、血清学的検査などがあげられるが、現在わが国では加熱死菌液を用いた試験管凝集反応 (TA) による抗 *B. canis* 凝集抗体検査が汎用されている [2]。しかしながら本法は菌液使用量や試験管など検査のコストが高く、かつ手法が煩雑であることから [3, 5]、多頭数の検査や疫学調査のためには適当な方法とはいえない。

抗 *B. canis* 凝集抗体検査はこれまでもコストの削減、煩雑さの軽減が期待できるマイクロタイター法 (MA) で検討されており [3, 5-7]、Kimuraら [6] はTAとMAの間に高い相関性を示している。彼らの方法ではMAの凝集像の観察を容易とするために、サフラニンで染色して結果判定を行っている。今回、われわれはサフ

ランニンで染色せずに、プレートを観察できるように、結果判定方法に工夫を加えその結果とTAを比較検討した。

また、抗 *B. canis* 凝集反応では溶血による非特異凝集の出現が報告されており [3, 5, 8, 9]、その要因の一つとして、ヘモグロビン (HGB) が影響するといわれている [1]。しかし、どの程度の溶血が検査に影響するかについて明らかにされていない。そこで、抗 *B. canis* 抗体陰性のSPFビーグル犬の血液を人工的に溶血させたものを用いて、HGBと非特異凝集との関係を検討した。

### 材料及び方法

**犬血漿サンプル：**TAとMAの比較のために、TAで過去に当センターで検査した検体のうち、凝集抗体陽性例46例 (凝集価 ≥ 1:160)、陰性例 (凝集価 < 1:160) 72例を選びMAと比較した。なお、これらは事前に肉眼で溶血サンプルでないことを確認している。

また、溶血の影響を検討するためにTAで < 1:20 のSPFビーグル犬9頭のEDTA処理全血を、-20℃で1

† 連絡責任者：河口雅登 (マルピー・ライフテック(株))

〒563-0011 池田市伏尾町103 ☎0727-53-0335 FAX 0727-54-2208

E-mail: masato-kawaguchi@ds-pharma.co.jp

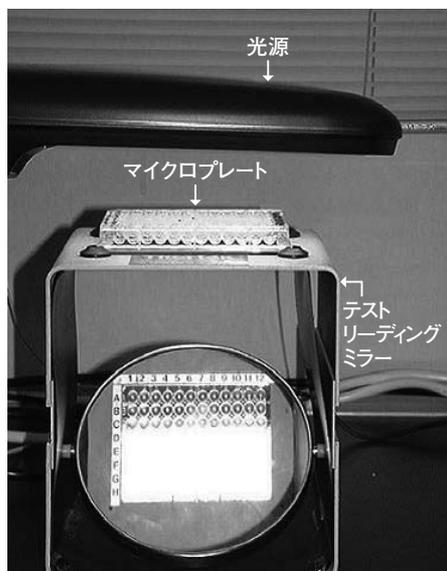


図1 テストリーディングミラー  
上から光を当て, 下の鏡で判定する.

表1 TA法とMA法の凝集反応の比較

| TA法<br>(試験管凝集反応) | MA法 (マイクロタイター) |    |
|------------------|----------------|----|
|                  | 陰性             | 陽性 |
| 陰性               | 72             | 0  |
| 陽性               | 0              | 46 |

MA, TAともに1:160以上を陽性と判定した.

表2 溶血検体のTA法とMA法の凝集価の比較

|       | MA法     | TA法     |
|-------|---------|---------|
| No. 1 | 1:20480 | 1:40960 |
| No. 2 | 1:40960 | 1:40960 |
| No. 3 | 1:20480 | 1:10240 |
| No. 4 | 1:40960 | 1:40960 |
| No. 5 | 1:40960 | 1:40960 |
| No. 6 | 1:20480 | 1:20480 |
| No. 7 | 1:40960 | 1:40960 |
| No. 8 | 1:40960 | 1:20480 |
| No. 9 | 1:20480 | 1:20480 |

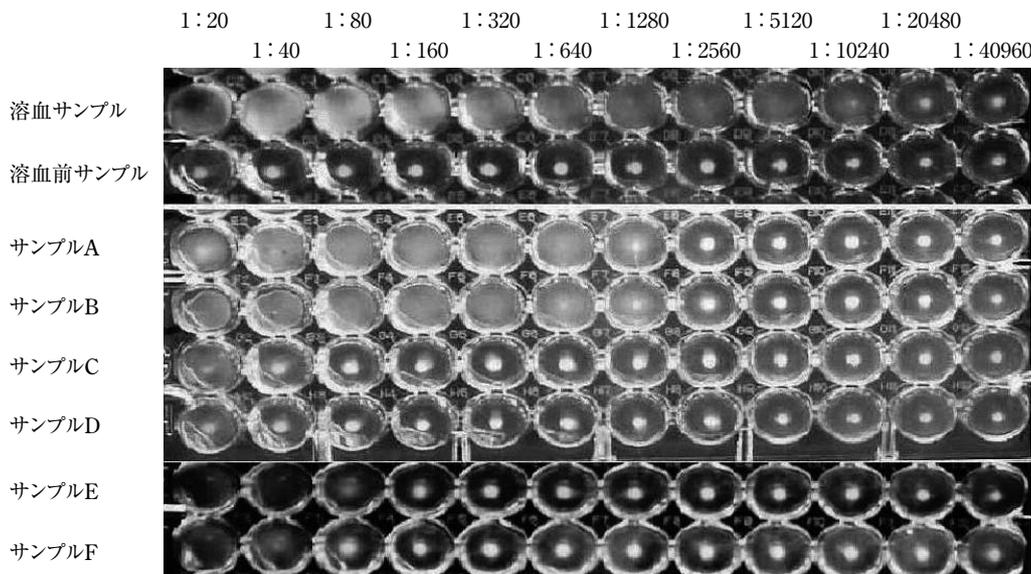


図2 MA法の凝集像

テストリーディングミラーから見た, 各サンプルのMA法の凝集像を示す.

各サンプルは1:20から2倍段階希釈しており, 溶血サンプル, 非溶血サンプル, サンプルA, B, C, D, E, Fのサンプルの凝集価は1:5120, <1:20, 1:640, 1:320, <1:20, <1:20, 1:40, 1:20となり, 非溶血サンプル, サンプルC, D, E, Fは陰性と判定される.

回凍結融解の前と後の遠心上清(血漿成分)を供試した. 凍結後の血漿(溶血血漿)を同一個体の凍結前の血漿(非溶血血漿)で1:1から1:128まで2倍段階希釈し, TAとMAで凝集価を測定した.

**TA**: 加熱死菌液(北里研究所, 埼玉)を用い添付説明書に従って実施した. すなわち, ガラス製5ml試験管にてリン酸緩衝食塩液(添付説明書のとおり作製)を用いて1:10から2倍段階希釈したサンプル0.5mlに加熱死菌液を0.5ml加え, 混和後50℃の恒温槽に24時間静

置し, 添付説明書のとおり判定した.

**MA**: 96穴U字硬質マイクロプレート(アズワン株, 大阪)にて, 1:20からTAで用いたものと同じリン酸緩衝食塩液を用い, 2倍段階希釈した血漿50μlに加熱死菌液50μlを加え, 混和後50℃インキュベーターで一晩静置後テストリーディングミラー(エーディア株, 東京)を用いて判定した[3, 5, 6](図1).

**HGB濃度測定**: 全自動血球計数器(日本光電工業株, 東京)で判定した.

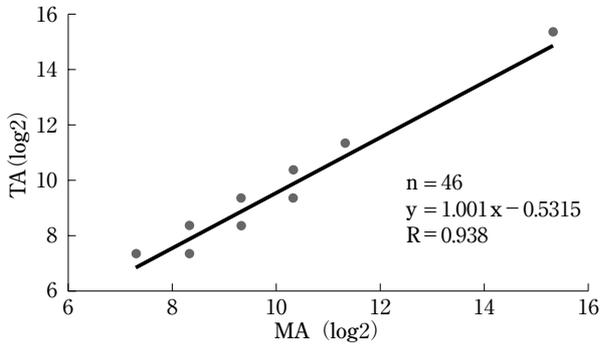


図3 TA法とMA法の相関図  
1:160以上のTA法とMA法の凝集価の相関図を示す。

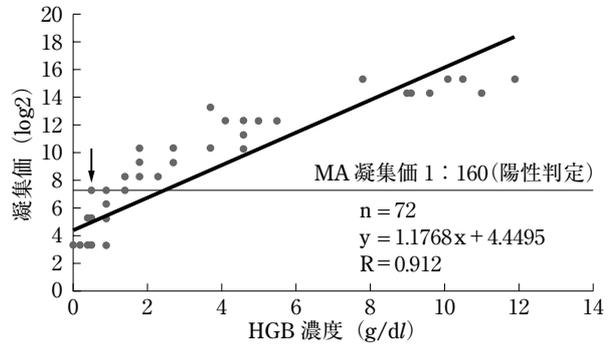


図4 MA法による溶血検体の凝集価とHGB濃度の相関図  
溶血検体とHGB濃度の相関性を示した。凝集価1:20未満は便宜上1:10として計算した。  
凝集価1:160(陽性判定)で最も低いHGB(0.5g/dl)を示した例を矢印で示す。

表3 血漿中HGB濃度と非特異凝集価との比較

| 血漿で希釈 | 倍率  | 1:1     | 1:2     | 1:4    | 1:8   | 1:16  | 1:32  | 1:64  | 1:128 |
|-------|-----|---------|---------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| No. 1 | HGB | 9       | 4.6     | 1.8    | 1.4   | 0.5   | 0     | 0     | 0     |
|       | 凝集価 | 1:20480 | 1:2560  | 1:640  | 1:160 | 1:40  | <1:20 | <1:20 | <1:20 |
| No. 2 | HGB | 11.9    | 4.6     | 1.8    | 1.4   | 0.5   | 0.2   | 0     | 0     |
|       | 凝集価 | 1:40960 | 1:5120  | 1:1280 | 1:320 | 1:160 | <1:20 | <1:20 | <1:20 |
| No. 3 | HGB | 9.6     | 3.7     | 2.3    | 0.9   | 0.5   | 0     | 0     | 0     |
|       | 凝集価 | 1:20480 | 1:1280  | 1:320  | 1:80  | <1:20 | <1:20 | <1:20 | <1:20 |
| No. 4 | HGB | 10.1    | 5       | 2.3    | 0.9   | 0.5   | 0     | 0     | 0     |
|       | 凝集価 | 1:40960 | 1:5120  | 1:320  | 1:160 | 1:140 | <1:20 | <1:20 | <1:20 |
| No. 5 | HGB | 10.5    | 5.5     | 2.7    | 1.4   | 0.9   | 0     | 0     | 0     |
|       | 凝集価 | 1:40960 | 1:5120  | 1:640  | 1:160 | 1:40  | <1:20 | <1:20 | <1:20 |
| No. 6 | HGB | 11      | 4.6     | 2.7    | 1.4   | 0.9   | 0     | 0     | 0     |
|       | 凝集価 | 1:20480 | 1:2560  | 1:640  | 1:160 | 1:40  | <1:20 | <1:20 | <1:20 |
| No. 7 | HGB | 10.5    | 4.6     | 2.7    | 1.4   | 0.9   | 0     | 0     | 0     |
|       | 凝集価 | 1:40960 | 1:10240 | 1:1280 | 1:160 | <1:20 | <1:20 | <1:20 | <1:20 |
| No. 8 | HGB | 7.8     | 4.1     | 1.8    | 0.9   | 0.4   | 0.2   | 0     | 0     |
|       | 凝集価 | 1:40960 | 1:5120  | 1:640  | 1:160 | 1:40  | <1:20 | <1:20 | <1:20 |
| No. 9 | HGB | 9.1     | 9.7     | 1.8    | 0.9   | 0.5   | 0     | 0     | 0     |
|       | 凝集価 | 1:20480 | 1:10240 | 1:320  | 1:80  | <1:20 | <1:20 | <1:20 | <1:20 |

陽性と判定された例のHGB濃度の最高値は1.6g/dl、最低値は0.5g/dl及び平均値と標準偏差(SD)は1.2g/dl±0.4であった。

### 成 績

図2に示すようにMAはテストリーディングミラーを用いなければならないが、あらかじめ菌液を染色することなく明瞭に凝集価の測定が可能であった。MAをTAと比較したところ、TAで陽性判定基準である、凝集価1:160を下回った72例はすべてMAでも<1:160、TAで≥1:160の46例はすべてMAでも≥1:160と、両法は完全に一致した(表1)。そして、陽性であった検体46例のTAとMAによる凝集価の逆数(log)の相関係数(R)は0.938であった(図3)。また人工的に溶血させた血漿(No.1~9)でもMAはTAと同じように非

特異反応が確認され、両法による凝集価もほぼ同じであった(表2)。

HGBと凝集価の検討では、人工溶血血漿(No.1~9)の段階希釈物のHGB濃度(g/dl)と、凝集価の逆数(log)を比較したところR=0.912を示した(図4)。なお便宜上<1:20を1:10として計算した。No.1~9はそれぞれ1:8, 1:16, 1:4, 1:8, 1:8, 1:8, 1:8, 1:8, 1:4希釈の時に陽性基準の最低ラインにある凝集価1:160を示した。これら希釈血漿(計72本)のHGB濃度(g/dl)の平均値と標準偏差(SD)は1.2±0.4、最高値は1.6及び、最低値は0.5であった(表3)。

## 考 察

今回われわれが検討したMAは, Kimuraら [6] が検討したサフラニン染色の作業をすることなくテストリーダーミラーで明瞭に凝集価を観察できた。

そして, この方法とTAによる凝集価を比較したところ, 芹川ら [5, 6] の報告と同様に両法は $R = 0.938$ と高い相関性を示した。陽性血漿はすべて陽性 ( $\geq 1:160$ ), 陰性血漿 ( $< 1:160$ ) はすべて陰性で両法は完全に一致した。また, 人工溶血血漿において両法による凝集価がほぼ一致したことから, MAでもTAと同様に溶血による非特異凝集がTAと同様に出現することが確認された。このことからTAの簡便な代用法としてMAを適用することが可能と思われる。MAはTAに比べ供試血漿量が少量で検査可能であるとともに試薬や器材など, 検査コストの削減, 検査手法の簡便化が期待できることから, ケンネルなどの多頭数の検査や野外疫学調査などにも容易に対応できるものと思われる。

さらに人工溶血血漿のHGB濃度とMAによる凝集価を比較したところ, 両者の間に高い相関性 ( $R = 0.912$ ) が示されたことから非特異凝集のおもな要因の一つとして, HGBが関与していると思われる。今回, 陽性判定基準の $1:160$ 以上を示したものの人工溶血血漿をさまざまな溶血度合いに希釈したもののうちの, HGB濃度の最低値は $0.5\text{g/dl}$ 以上であったことから, この値はMAによる*B. canis*抗体検査の溶血による非特異反応の出現の一つの指標になると思われる。溶血の程度を肉眼で観察することは個人差があるため, 溶血サンプルを抗*B. canis*凝集抗体検査に供する場合は, HGB濃度を予め測定することで偽陽性の判定を回避することも可能だと考えられる。

著者らの知るかぎりこれまで*B. canis*の凝集反応での溶血の影響についての検討結果の報告はなく, 本試験でその可能性が示されたことは意義深いと考えられる。

しかし, 本試験の結果だけでは実際にHGBが非特異凝集の要因であると断定するには至らないだろう。このため両者との関係をさらに明らかにするため今後HGBの添加実験等を行う必要があると思われる。

*B. canis*以外の凝集反応については, B型肝炎ウイルス表面抗体キット (特殊免疫研究所等パンフレット) の添付説明書に溶血HGBと非特異凝集との関係の影響についての記載があるが, HGBと非特異凝集との関係についてはこれまでほとんど検討はされていない。今後*B. canis*以外の凝集反応についてもHGBと非特異凝集との関係について検討していきたい。

犬血清, 及び全血の採材にご協力いただいた各動物病院の先生方に深謝する。

## 引 用 文 献

- [1] Greene CE, Carmichael LE : Canine brucellosis, Infectious diseases of the dog and cat, Greene CE ed, 3rd ed, 369-381, Elsevier, Philadelphia (2006)
- [2] 小宮智義: プルセラ症の診断法, SA Medicine, 3, 12-16 (2007)
- [3] 今岡浩一: 犬プルセラ症の現状と課題, 日獣会誌, 62, 5-12 (2009)
- [4] Scheftel J : Brucella canis : 人獣共通伝播の可能性, J-VET 4, 壁谷英則, 14-19 (2003)
- [5] 芹川忠夫, 村口武彦, 中尾 登, 山田淳三: *Brucella canis* 抗体検査のための新しいマイクロタイター凝集反応検査法, Exp Anim, 26, 139-141 (1977)
- [6] Kimura M, Imaoka K, Kamiyama T, Yamada A : Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis, J Vet Med Sci, 70, 707-709 (2008)
- [7] Damp SC, Crumrine MH, Lewis GE : Microtiter plate agglutination test for *brucella canis* antibodies, Appl Microbiol, 25, 489-490 (1973)
- [8] 荒島康友, 片岡 康, 須田沖夫: 犬プルセラ症の課題と対応, 日獣会誌, 63, 13-15 (2010)
- [9] 中村遊香: 犬プルセラ症をどのように診察するか?, SAC, 159, 25-29 (2010)

Detection of Anti-*Brucella canis* Agglutination Antibodies by Microtiter and,  
Study the Effects of Hemolysis

Masato KAWAGUCHI\*†, Namiko SAITO, Chihiro KATSUKAWA and Takehisa SOMA

\* *Marupi Lifetech Co., Ltd., 103 Fushio-cho, Ikeda-shi, 563-0011, Japan*

SUMMARY

In the present study, we compared the activities of anti-*Brucella canis* agglutination antibodies obtained by the traditionally used tube agglutination (TA) method and the microtiter method (MA). In addition, we studied the relationships between hemoglobin (HGB) concentration, considered to be a factor in nonspecific agglutination, and the nonspecific agglutination activity by analyzing dog plasma samples. The results from MA and TA were in complete accordance in all dog plasma samples obtained from 72 seronegative and 46 seropositive dogs. A high correlation coefficient ( $R = 0.938$ ) was shown between agglutination titers (log) tested by both methods. To study the effect of hemolysis, we obtained whole blood samples from nine specific-pathogen free (SPF) beagles and then intentionally hemolyzed the samples. The supernatants were diluted to various concentrations of HGB and the agglutination titers were determined. The results obtained showed a high correlation coefficient ( $R = 0.912$ ) between the HGB concentrations and agglutination titers. The lowest HGB concentration was 0.5 g/dl among diluents with 1 : 160 or higher antibody titers (positive criterion). These observations suggested that HGB was an important factor in nonspecific agglutination, and therefore, that pre-termination of HGB concentration would be helpful in testing hemolyzed plasma.

— Key words : *B. canis*, hemoglobin (HGB) concentration, hemolysis, microtiter plate method, nonspecific agglutination activity.

† Correspondence to : Masato KAWAGUCHI (*Marupi Lifetech Co., Ltd.*)

*103 Fushio-cho, Ikeda-shi, 563-0011, Japan*

*TEL 0727-53-0335 FAX 0727-54-2208 E-mail : masato-kawaguchi@ds-pharma.co.jp*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 64, 957 ~ 961 (2011)*