

馬パラチフスの血清診断のためのマイクロ凝集反応法

丹羽秀和^{1)†} 木原博文²⁾ 永井英貴³⁾ 秋庭正人⁴⁾ 國保健浩⁴⁾
加藤一典⁵⁾ 安齊 了⁶⁾ 高井伸二⁷⁾

- 1) (特)日本中央競馬会競走馬総合研究所 (〒329-0412 下野市柴 1400-4)
- 2) 農林水産省動物検疫所 (〒235-0008 横浜市磯子区原町 11-1)
- 3) 農林水産省動物医薬品検査所 (〒185-8511 国分寺市戸倉 1-15-1)
- 4) (国研)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)
- 5) 北海道日高家畜保健衛生所 (〒056-0003 日高郡新ひだか町静内旭町 2-88-5)
- 6) (特)日本中央競馬会 (〒106-8401 港区六本木 6-11-1)
- 7) 北里大学獣医学部 (〒034-8628 十和田市東 23 番町 35-1)

Microplate Agglutination Test for Serological Diagnosis of Equine Paratyphoid

Hidekazu NIWA^{1)†}, Hirofumi KIHARA²⁾, Hidetaka NAGAI³⁾, Masato AKIBA⁴⁾,
Takehiro KOKUHO⁵⁾, Kazunori KATO⁶⁾, Toru ANZAI⁶⁾ and Shinji TAKAI⁷⁾

- 1) *Equine Research Institute, Japan Racing Association, 1400-4 Shiba, Shimotsuke, 329-0412, Japan*
- 2) *Animal Quarantine Service, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 11-1 Haramachi, Isogo-ku, Yokohama, 235-0008, Japan*
- 3) *National Veterinary Assay Laboratory, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 1-15-1 Tokura, Kokubunji, 185-8511, Japan*
- 4) *National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*
- 5) *Hokkaido Hidaka Livestock Hygiene Service Centre, 2-88-5 Shizunai Asahicho, Shinhidaka-cho Hidaka-gun, 056-0003, Japan*
- 6) *Japan Racing Association, 6-11-1 Roppongi, Minato-ku, 106-8401, Japan*
- 7) *School of Veterinary Medicine, Kitasato University, Higashi 23-35-1, Towada, 034-8628, Japan*

(2018年4月23日受付・2018年9月4日受理)

はじめに

馬パラチフスは *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Abortusequi* (*S. Abortusequi*) による流産、精巢炎、多発性の化膿性疾患を主徴とする伝染性の疾病で、家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されている。わが国では、1915年に青森県で初めて確認され、第二次世界大戦前及び戦後しばらくの間は北海道や東北地方を中心に確認された [1]。近年では本病の発生数は減

少しているが、重種馬の生産地を中心に発生がみられている [2]。一方、海外では清浄化された地域が多く、発生報告は少ないが、アジア、アフリカ、ヨーロッパの一部などで散発的な発生が確認されている [3]。

本病の確定検査に用いられる試験管凝集反応法 (tube agglutination test: TAT) は、市販の「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製)を抗原とする血清診断法として広く利用されている [4]。しかし、TATは肥育用素馬の輸入検疫等で一

† 連絡責任者: 丹羽秀和 (特)日本中央競馬会競走馬総合研究所)

〒329-0412 下野市柴 1400-4 ☎0285-39-7589 FAX 0285-40-1064 E-mail: niwa@equinst.go.jp

† Correspondence to: Hidekazu NIWA (Equine Research Institute, Japan Racing Association)

1400-4 Shiba, Shimotsuke, 329-0412, Japan

TEL 0285-39-7589 FAX 0285-40-1064 E-mail: niwa@equinst.go.jp

表1 各希釈用液におけるマイクロ凝集反応法 (MAT) の再現性と試験管凝集反応法 (TAT) との比較

被検血清	TAT	MAT									
		VBS			PBS			生理食塩水			
		1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	1st	2nd	3rd	
1	1,280 ^{a)}	- ^{b)}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	1,280	-	-	-	-	-	-	≥ 2,560	-	-	-
4	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	640	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	320	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
参照用サンプル	1,280	-	-	-	-	-	-	≥ 2,560	≥ 2,560	-	-

a) TATにおける凝集価

b) TATの凝集価と一致した場合を-, 異なった場合は凝集価で示す.

度に数百頭の検査を実施する場合, 多数の器具や大量の試薬を必要とすることから, 多検体処理には不適当な方法である. 一方, マイクロ凝集反応法 (microplate agglutination test: MAT) は, 1986年に中野によって報告された96穴丸底マイクロプレート (以下, マイクロプレート) を用いた凝集反応法 (第34回北海道家畜衛生業績発表会集録, 1986) であり, TATと同じ診断用菌液を用いることから, TATの変法といえる方法である. MATはマイクロプレートの1ウェルをTATでの試験管1本分として使用できることから, 多検体の処理が容易となり, 検査の省力化が可能となる. さらに, 1検体当たりに必要な試薬量はTATと比較して10分の1になることから, コストの削減という点からも有効な方法と考えられる. しかし, MATには標準化された術式及び診断基準が存在せず, 輸入検疫や種畜検査などの公的な検査には使用できなかった. また, 中野の方法では, 血清や診断用菌液の希釈のためペロナル緩衝生理食塩水 (VBS) を用いているが, わが国ではVBSに含まれるバルビタール及びバルビタールナトリウムが第三種向精神薬に指定されているため, その保管や取り扱いに制約がある.

このような背景から, 平成26~27年にかけて設置された馬防疫検討会「馬パラチフスの診断法に関する専門会議」において実施が容易なMATの術式並びに判定基準を確立するとともに, 取り扱いが容易な生理食塩水, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) の希釈用液としての適否が検討された. さらに, 確立したMATの術式について馬パラチフスの血清診断法として再現性及び信頼性を検証するため, ダブルブラインド方式による多施設間での妥当性確認試験 (バリデーションテスト) を実施し, TATの代替法としてMATが使用できるか否かが評価され, MATはTATと同様の成績が得られる試験法であることが示された. 本稿では, 上記専門会議で得られたMATに関する検討結果並びに確立されたMATの術

式について紹介したい.

MATに用いる希釈用液の検討

TATにおいて陰性, 疑陽性, 陽性の各判定基準となる1:320, 1:640, 1:1,280の凝集価を示すS. Abortusequi実験感染馬血清7検体及び参照用サンプルの計8検体を用い, 3種類 (VBS, PBS, 生理食塩水) の希釈用液を用いたMATを3回実施し, TATとの凝集価を比較した. その結果, VBS及びPBSを希釈用液として用いた場合には, 8検体すべての凝集価が3回の試行ともTATの結果と一致し, 生理食塩水を希釈用液として用いた場合にも2検体 (延べ3検体) でTATとMATの凝集価に差が認められたのみであったことから, いずれの希釈用液を用いた場合でも高い再現性が認められた (表1).

次に, 各希釈用液における凝集像を比較するため, 自然感染馬血清30検体を用いてMATを実施した結果, 希釈用液による凝集像の違いはなかったが, 一部の検体においてプロゾン現象と考えられる反応が認められた. プロゾン現象の出現率は生理食塩水 (7/30検体: 23.3%) で最も高く, 次いでPBS (3/30検体: 10.0%), VBS (1/30検体: 3.3%) の順であった. ただし, プロゾン現象の有無にかかわらず, すべての検体で凝集価を決定することが可能であった.

さらにTATとMATの凝集価の一致度について検討するために輸入検疫で採取した輸入馬血清823検体 (TATにおいて陽性であった1検体, 疑陽性であった4検体, 陰性であった818検体) において, 各希釈用液を用いたMATを実施し, TATの結果と比較した結果, TATとMATの凝集価が同じであった検体の割合 (一致率) はVBSで61.6%, PBS及び生理食塩水で67.1%であった. TATにおいて陽性または疑陽性となった検体は, MATにおいてもそれぞれ同じ判定結果となった. ピアソンの積率相関分析 [5] による相関係数はVBSで

表2 輸入馬血清 823 検体における各希釈用液を用いた MAT と TAT の凝集価との比較

	MAT (n=823)		
	VBS	PBS	生理食塩水
TAT との差異			
一致	507 ^{a)}	552	552
一致率 (%)	61.6	67.1	67.1
差異の内訳			
1 管 低	284 ^{a)}	235	234
1 管 高	26	34	35
2 管 低	6	2	2
2 管 高	0	0	0
相関係数	0.877	0.886	0.885
重み付け κ 係数	0.992	0.993	0.993

a) 検体数

0.877, PBS で 0.886, 生理食塩水で 0.885 となり, いずれの希釈用液においても強い正の相関 ($P < 0.001$) が認められた (表 2). また, MAT 及び TAT 間の一致度を評価するため, 重み付けを行ったコーエンのカップ係数 (κ 係数) [6, 7] を算出したところ, いずれの希釈用液においても 0.992~0.993 と非常に高い一致度が得られ, MAT は希釈用液の種類に関係なく TAT の結果と統計学的に一致することが確認された. しかし, 試薬の取り扱いやすさ, 多検体における一致度, 比較的低いプロゾーン現象の出現率から, 希釈用液として PBS を使用した方法が MAT の術式として採用された.

多施設バリデーションテスト

ダブルブラインド法による MAT の多施設バリデーションテストを実施した (表 3). 血清の配布元が, 実験感染馬血清 41 検体, 自然感染馬血清 6 検体及び健康馬血清 30 検体を含む血清 77 検体を抽出して TAT を実施するとともに, 5 施設 (A~E) に同じ血清を送付した. 各施設においては希釈用液に PBS を用いた MAT を実施し, 試験成績は血清の抽出や試験の実施に関与しない第三者に提出された. 第三者が各施設の MAT の成績と配布元の実施した TAT の成績を照合し, 統計学的解析を行った.

5 施設 (A~E) の実施した MAT と配布元の実施した TAT の凝集価は一致もしくは 1 管のずれに留まり, MAT と TAT 間の相関係数は 0.893~0.954 (平均 0.920) と強い相関 ($P < 0.001$) が確認された. さらに, 重み付け κ 係数は, すべての施設において 0.993 以上であり, TAT と各施設で実施された MAT の凝集価は非常に高い一致度であった. また, TAT と MAT の凝集価が一致しなかった検体においては, 5 施設中 2 施設 (B 及び C) では TAT よりも MAT の凝集価が高かった検体数が TAT よりも MAT が低かった検体数よりも著しく多かつ

表 3 検査施設別の MAT と TAT の凝集価の比較

	MAT (n=77)				
	A ^{a)}	B	C	D	E
TAT との差異					
一致数	65 ^{b)}	52	44	61	63
一致率 (%)	84.4	67.5	57.1	79.2	81.8
差異の内訳					
1 管 低	4 ^{b)}	2	1	7	5
1 管 高	8	23	32	9	9
相関係数 ^{b)}	0.928	0.899	0.893	0.927	0.954
重み付け κ 係数	0.998	0.995	0.993	0.997	0.966

a) 検査施設 b) 検体数

たが, 残りの 3 施設では TAT よりも MAT が高かった検体数がやや多かったものの顕著な差は認められなかった.

考 察

中野の開発した MAT では希釈用液として VBS を使用することが推奨されている. しかし, VBS の調製に必要な試薬は厳重な管理が求められることから, 今回, MAT の標準的な術式を決定するために, VBS 並びに VBS の代替として調製が容易で安全性に優れた PBS と生理食塩水について検討した. TAT の凝集価が明らかな S. Abortusequi 実験感染馬血清を用いた繰り返しの検討では MAT は希釈用液の種類によらず高い再現性が確認され, 輸入馬血清を用いた検討では MAT はいずれの希釈用液を用いた場合にも統計学的に TAT と強い相関及び非常に高い一致度が認められた. このことから, MAT で得られる凝集価は, 希釈用液の種類に関係なく TAT で得られる凝集価とほぼ一致し, 同じ判定基準が使用可能と考えられた. 5 施設による多施設バリデーションテストにおいても TAT と MAT の結果に強い相関関係並びに高い一致度が確認された. B 群 (O4 群) サルモネラ属菌感染ヒト血清を用いた TAT と MAT との比較では一致率は 70% と報告されており [8], 犬ブルセラ病罹患犬血清を用いた TAT と MAT の比較では相関係数は 0.945 と報告されている [9]. 今回の検討で得られた成績は, これらの成績と統計学的にもほぼ同等であり, MAT は TAT の代替法として馬パラチフスの血清診断に使用できると考えられた.

一方, プロゾーン現象の出現率は希釈用液によって異なった. プロゾーン現象は抗原または抗体のどちらか一方が過剰であるときに出現する現象であることが報告されているが [10], 今回検討を行った 3 種類の希釈用液の中で, 生理食塩水を使用した場合に最も高頻度で本現象が出現した. 抗原抗体反応は塩類や pH の影響を受けることから [11], 緩衝作用のない生理食塩水では, 緩

衝作用のある VBS や PBS を希釈用液とした場合に比べて、プロゾーン現象の出現が高くなったと考えられた。今回の検討では、凝集価の判定に影響を与えるような現象の出現は認められなかったが、日常の検査業務で MAT に使用する希釈用液としては、試薬の調製が容易で緩衝作用を有する PBS が最適であると考えられた。

多施設バリデーションにおいて施設間の一致率に最大 27.3% の差が認められ、一致率の低かった施設では TAT よりも MAT の凝集価が高くなる傾向が認められた。MAT や TAT における凝集の判定は非凝集沈降物の有無を肉眼で判断するため、主観によって判定結果に影響が出る可能性があり、今回の検討においても実施者間の習熟度の違いなどが判定に影響した可能性は否定できない。また、本法を含め階段希釈によって抗体価を決定する試験では、一般的に希釈操作に習熟した実施者であっても ±1 管の差は避けられない誤差と考えられている。多施設バリデーション試験で認められた MAT と TAT との凝集価の差は 1 管以内であり、さらに実施したすべての試験において参照用サンプルによる精度管理が実施されていることから、MAT の実施に伴って施設間で生じうる誤差はわずかであると考えられた。本研究により、MAT は TAT と同様の成績が得られる試験法であることが示され、TAT の代替法として馬パラチフスの血清診断に使用できるものと考えられた。

MAT の 術 式

蓋付の滅菌済み 96 穴丸底マイクロプレートを縦向きに使用し、マイクロプレートの H の列に希釈用液として PBS (1l 当たり : NaCl 8.0g, KCl 0.2g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g, KH₂PO₄ 0.2g, pH 7.4) 90 μ l を分注し、H の列以外 (G ~ A 列) には PBS 50 μ l を分注する。次に、H の列に無処理の被検血清 10 μ l を接種してよく混和し、次いで H の列の希釈血清 50 μ l を G の列に移してよく混和し、以降 F から A の列まで順に 2 倍階段希釈列を作製する。その後、PBS を用いて 15 倍に希釈した馬パラチルス急速診断用菌液 50 μ l を各ウェルに接種し、マイクロプレートミキサーで希釈血清と診断用菌液をよく混和させる。密閉容器内にマイクロプレートを入れ、37 $^{\circ}$ C で水平となるように 18 ~ 24 時間静置した後、イムノビューアー (Immuno viewer-MU, Jookoo co., 東京) を用いてプレート底の凝集像を観察する (図)。凝集の判定は目玉状の非凝集沈降物の有無とし、肉眼的に非凝集沈降を認めない最高希釈倍率をその検体の凝集価とする。結果の判定は、TAT [4] と同様に 1 : 1,280 以上を示す検体を陽性、1 : 640 を示す検体を疑陽性、1 : 320 以下を示す検体を陰性とする。なお、試験の精度管理法としてマイクロプレートの 1 希釈列に凝集価が 1,280 倍を示すことが確認されている指示陽性血清 (参

希釈 20 40 80 160 320 640 1,280 2,560

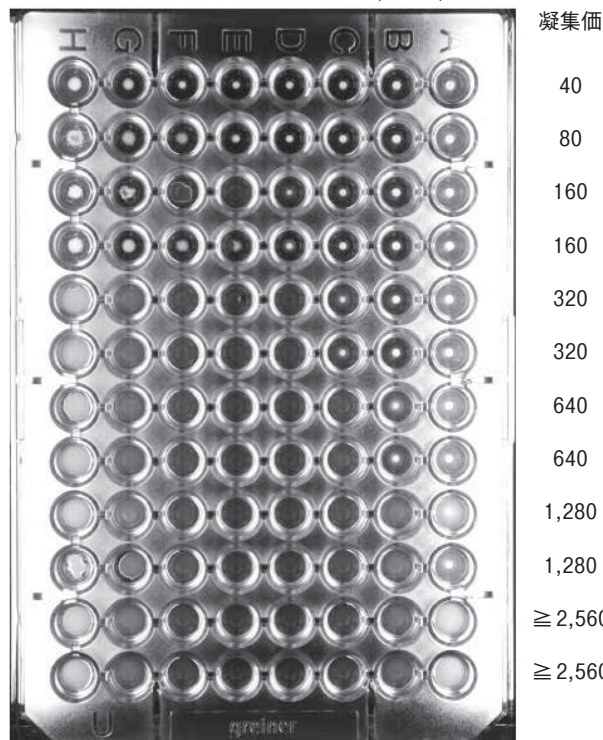


図 MAT における凝集像
イムノビューアーを用い、肉眼的に目玉状の非凝集沈降物が認められない最高希釈の倍率を凝集価とした

照用サンプル) も使用可能であり、当該血清は日本中央競馬会競走馬総合研究所から入手できる。

最 後 に

上記の成績をもとに、現在、(国研)農業・食品産業技術総合研究機構が製造販売する *S. Abortusequi* 菌液の製造販売承認申請記載事項の一部変更が行われ、MAT による確定診断法の抗原としても使用可能となった。なお、平成 29 年に製造された「馬パラチルス急速診断用菌液」の使用説明書よりマイクロ凝集反応の術式が記載されている。本稿が、馬パラチルスにおけるマイクロ凝集反応法の実施にかかわる獣医師の方々のための科学的なバックボーンとしてご活用いただければ幸いである。

引 用 文 献

- [1] 青木貞治：馬パラチルス，家畜伝染病の診断，農林水産省家畜衛生試験場技術者集談会編，第 1 版，422-430，文永堂，東京 (1967)
- [2] Akiba M, Uchida I, Nishimori K, Tanaka K, Anzai T, Kuwamoto Y, Wada R, Ohya T, Ito H : Comparison of *Salmonella enterica* serovar Abortusequi isolates of equine origin by pulsed-field gel electrophoresis and fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting, *Vet Microbiol*, 92, 379-388 (2003)
- [3] 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 Invet*, 28, 440-444 (2016)
- [4] 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)
- [5] Mukaka MM : A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research, *Malawi Med J*, 24, 69-71 (2012)
- [6] Cohen J : A coefficient of agreement for nominal scales, *Educ Psychol Meas*, 20, 37-46 (1960)
- [7] Kundel HL, Polamsky M : Measurement of observer agreement, *Radiology*, 228, 303-308 (2003)
- [8] Barsoum IS, Awad AY : Microtiter plate agglutination test for *Salmonella* antibodies, *Appl Microbiol*, 23, 425-426 (1972)
- [9] Kimura M, Imaoka K, Suzuki M, 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)
- [10] Shimabukuro FH, Costa VM, Silva RC, Langoni H, da Silva AV, de Carvalho LR, Domingues PF : Prozone effects in microscopic agglutination tests for leptospirosis in the sera of mice infected with the pathogenic *Leptospira interrogans* serovar Canicola, *Mem I Oswaldo Cruz*, 108, 668-670 (2013)
- [11] 河合 忠 : 酵素免疫測定法, 石川栄治他編, 第3版, 8-21, 医学書院, 東京 (1987)