

マイクロタイターを使用したニューカッスル病HI検査の実用化試験成績

| | |
|-------|---|
| 誌名 | 鶏病研究会報 |
| ISSN | 0285709X |
| 著者名 | 井上,勇 三友,勇 野本,貞夫 渡辺,文男 斎藤,憲彦 岡,豊夫 |
| 発行元 | |
| 巻/号 | 7巻4号 |
| 掲載ページ | p. 191-194 |
| 発行年月 | 1971年12月 |

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



《業 績 発 表》

マイクロタイターを使用したニューカッスル病 HI 検査の実用化試験成績

井上 勇・三友 勇・野本貞夫・渡辺文男

(埼玉県家畜衛生試験場)

斎藤憲彦・岡 豊夫 (埼玉県大宮家畜保健衛生所)

Cooke Engineering Company 製の Micro-titer system (以下 M 法と略) を用い、ニューカッスル病 HI-test への応用を試みトレイ法との比較や再現性、血清希釈のためのダイリューターの回転回数および希釈に要する時間の吟味を行なった。その結果従来の術式よりも容易で、しかも現行法ときわめてよく一致する成績が得られた。以下実用化試験の概要について報告する。

I. 使用器具

プレート：厚さ 11 mm, 82.5×128.6 mm のプラスチック製 (V 字型使用) で、トレイと同様な穴があいており、8 列の 12 穴よりなっている。

ドロップパー：一滴が 0.025 ml に調整されたもので滴下用のピペットの役目をする。

ダイリューター：長さ 184 mm のステンレス製で、先端に 0.025 ml 吸いこむように考案されており、希釈用のピペットの役割りをする。

検量紙：沓紙よりできており、リングが印刷されていて、リング内に溶液が一面に広がった場合 0.025 ml に相当する。

II. 術式

まず検量紙を用いてドロップパーとダイリューターの検定を行なった。ドロップパーの場合には滴下し、ダイリューターの場合にはリングの中央 (+ 印してある) に軽く押しつける方法で行なった。

検定後ドロップパーで希釈液を一滴ずつプレートの穴に滴下し、つぎにダイリューターの先端を血清にふれさせて吸収させ、プレートの穴に立てていく。プレートは横に使用すれば 8 検体、縦に使用した場合は 12 検体の検査が可能である。そして指先または手の掌で、ダイリューターを同時

(8~12本) に回転させて希釈した。使用したダイリューターは蒸留水で洗い、ガーゼ等で液を吸い取った後バーナーで軽く焼いて冷却させ再使用した。

希釈後ドロップパーで抗原を (4 u) 一滴ずつ滴下し、10 分感作後 0.5% 赤血球浮游液 (RBC) をドロップパーで 2 滴ずつ滴下し、蒸発を防ぐ目的でプレートを重ね、一番上段にはシーリング行なった。シーリングのかわりに、空のプレートを最上段にかさねても目的はかなえられた。

判定は 30~60 分感作後 45 度の角度に傾斜させ、血球が完全に一本の線状に流れるのを血球凝集抑制反応陽性と判定した。

沓紙を用いる場合、第二穴よりドロップパーで希釈液を一滴ずつ滴下し、浸出液 (20 倍) をピペットで第一穴目と第二穴目にそれぞれ 0.025 ml 入れ、第二穴目よりダイリューターで希釈を行ない以下同様の方法で実施した。

以上の術式を要約して表 1 に示した。

III. 調査項目

(1) トレイ法との比較

血清 54 検体についてトレイ法との比較を行なった。トレイ法は一般に行なわれている術式で行ない、沓紙については 30 検体実施した。

(2) 回転回数

ダイリューターを使用する場合、何回の回転で完全に希釈できるのかを検討するため、血清 12 検体を用いそれぞれ 5, 10, 15 回回転させて比較を行なった。

(3) 再現性

血清 12 検体についてそれぞれ 5 回実施した。

表 1. Micro titer 法 (HI) 術式

(血清使用)

| 希 積 倍 数 | 2 | 4 | 8 | 4.096 | 対 照 | 備 考 |
|----------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------------|
| 希 積 液 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.05 | ド ロ ッ パ ー |
| 血 清 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | ダ イ ル ー タ ー |
| 抗 原 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | — | ド ロ ッ パ ー |
| 10分 感作 | | | | | | |
| 0.5% RBC | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | ド ロ ッ パ ー |
| (沓紙吸着) | | | | | | |
| 希 積 倍 数 | (溶出した血清成分をピペットで) | | | | 対 照 | 備 考 |
| | 20 | 40 | 80 | | | |
| 希 積 液 | — | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | ド ロ ッ パ ー |
| 血 清 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | ダ イ ル ー タ ー |
| 抗 原 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | 0.025 | — | ド ロ ッ パ ー |
| 10分 感作 | | | | | | |
| 0.5% RBC | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | ド ロ ッ パ ー |

この場合5検体を同時に行ない、位置により成績のぶれがあるかどうかあわせ検討を行なった。

(4) 希積の所要時間

ピペットで希積する場合(トレイ法)と、ダイリューターで希積する場合の所要時間を、5人の技術者について比較した。

(5) 沓紙法での溶出についての一方法(沓紙溶出変法)

現行法では、0.8 mlの溶出液で溶出し20倍血清相当として使用している。M法では少量(0.025 ml)で、しかもダイリューターに吸わせるため必要量はきわめて少ない利点がある。それと沓紙法でも、もっと低いHI価が得られないだろうかという期待もある。このようなことを考慮し、溶出液を従来の半分の0.4 mlで溶出し、これを10倍希積血清相当として、沓紙法(トレイ)およびM法(沓紙)との比較を行なった。

IV. 試験成績

トレイ法との比較は散布図で図1、図2に示した。回転回数成績は表2、再現性は表3、沓紙吸着で溶出の変法を比較した成績は表4に示した。

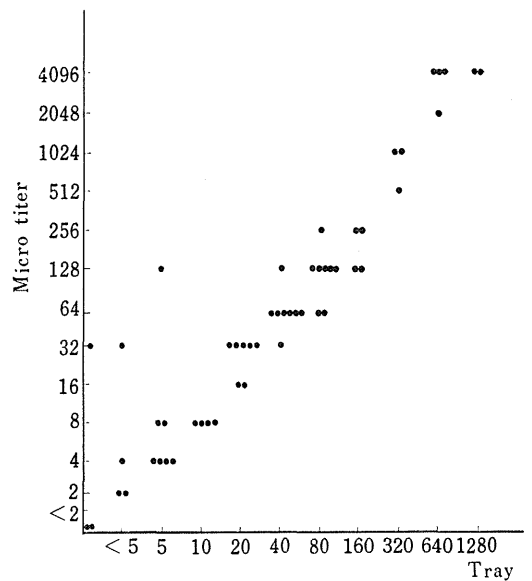


図 1. 散布図(血清)

希積所要時間は5人の平均時間が、トレイ法15分46秒、M法1分53秒であった。

V. 考察と要約

(1) トレイ法との比較では、血清使用および沓紙の場合ともよく一致したが、少数例にやや高い

表 4. 沪紙溶出変法との比較

| 方法 No. | 沪紙法 (トレイ) | M 法 (沪紙) | M 法 (沪紙溶出変法) |
|-----------|--------------|-------------|-----------------|
| 1 | < 20 | < 20 | 10 |
| 2 | — | — | — |
| 3 | — | — | 10 |
| 4 | — | < 20 | 10 |
| 5 | — | — | — |
| 6 | — | — | 10 |
| 7 | — | — | 10 |
| 8 | < 20 | — | 20 |
| 9 | < 20 | 20 | 20 |
| 10 | — | < 20 | 10 |
| 11 | 320 | 640 | 320 |
| 12 | < 20 | < 20 | 10 |
| 13 | 2,560 | 2,560 | 640 |
| 14 | 1,280 | 2,560 | 640 |
| 15 | 640 | 1,280 | 640 |
| 16 | 1,280 | 1,280 | 1,280 |
| 17 | 160 | 160 | 160 |
| 18 | 1,280 | 2,560 | 320 |
| 19 | 640 | 640 | 160 |
| 20 | 1,280 | 1,280 | 160 |
| 21 | 40 | 40 | 40 |
| 22 | 1,280 | 1,280 | 320 |
| 23 | 40 | 40 | 80 |
| 24 | 1,280 | 2,560 | 320 |
| 25 | 40 | 80 | 20 |
| 26 | 40 | 40 | 20 |
| 27 | 80 | 80 | 20 |
| 28 | 40 | 40 | 10 |
| 29 | 2,560 | 5,120 | 640 |
| 30 | 80 | 80 | 20 |

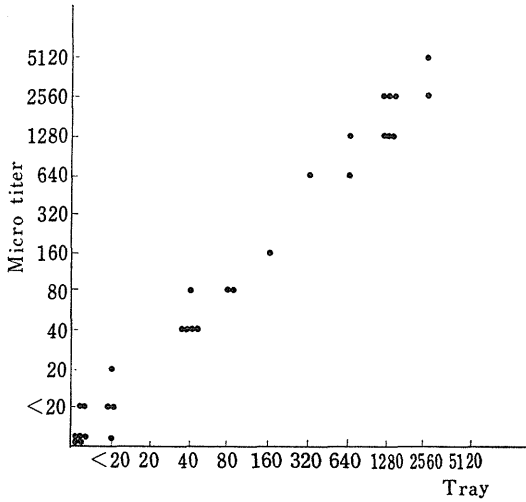


図 2. 散布図 (沪紙)

表 2. ダイリユーター回転回数と HI 値との関係

| 回数 | 5 | 10 | 15 |
|--------|-----|-----|-----|
| 血清 No. | | | |
| 1 | 8 | 8 | 8 |
| 2 | 2 | 2 | <2 |
| 3 | 4 | 8 | 4 |
| 4 | 16 | 4 | 16 |
| 5 | 32 | 64 | 32 |
| 6 | 32 | 256 | 64 |
| 7 | 32 | 64 | 32 |
| 8 | 128 | 256 | 256 |
| 9 | 64 | 128 | 256 |
| 10 | 256 | 256 | 256 |
| 11 | 256 | 256 | 256 |
| 12 | 64 | 128 | 64 |

[注] 数字は HI 値

表 3. 再現性

| 回目 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
|--------|-------|-----|-------|-----|-----|
| 血清 No. | | | | | |
| 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 4 |
| 4 | 4 | 8 | 8 | 8 | 4 |
| 5 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| 6 | 32 | 32 | 32 | 32 | 32 |
| 7 | 32 | 32 | 32 | 32 | 16 |
| 8 | 64 | 64 | 64 | 64 | 64 |
| 9 | 512 | 512 | 512 | 256 | 256 |
| 10 | 1,024 | 512 | 2,048 | 256 | 64 |
| 11 | 512 | 512 | 512 | 512 | 16 |
| 12 | 64 | 64 | 64 | 64 | 64 |

[注] 同一検体を 5 回実施 (同時)

HI 値が得られた。推計学的には正の相関がみられ、相関係数を算出して F 検定を行なったところ血清例、沪紙例ともトレイ法とは 1% 水準で有意であった。

(2) ダイリユーターの回転回数と HI 値の関係は、3 方法の間に 3 管以上の差が認められたのが 1 例、2 管以上の差が 2 例、あとは 1 管の差かまたは完全に一致する成績が得られた。この結果、5 回以上の回転で十分希釈されることが解明された。

(3) 再現性についてみると、大部分は再現性とみ 2 管以上の差がみられたのは 2 例で、いずれ

も一番端にみられた。このことはダイリューターを同時に回転させる際、一番端が希釈されにくい傾向を示していると考えられる。したがって実際の実施にあたっては、この点をとくに注意する必要がある。

(4) 滷紙溶出変法は、他の2法にくらべて30例中10例が2管以上低いHI価であった。このことは、溶出液が少量のために十分溶出されなかったためと考えられ、今後さらに検討を必要とした。しかし、現行の滷紙法よりさらに低いHI価が得られ注目に値した。

(5) 希釈に要する時間は、ピペットと比較して約1/8の所要時間できわめて能率的であった。

(6) 使用する抗原、RBCとも従来の方法より1/6~1/8量できわめて経済的であった。

以上M法についての諸条件を吟味したところ、技術的にも経済的にもすぐれていることを確認し、実用化が可能であった。なお、HA抗原定量についても可能であった。

終りに、本試験を実施するにあたりご指導とご助言をいただいた、新潟中央家畜保健衛生所の尾田技師、農林省動物医薬品検査所西村博士に厚く敬意を表します。

なお、この成績の概要は第34回日本獣医畜産学会において発表した。

《文献抄録》

1. 鶏のCRD病変と*E. coli*血清型の関係

STIPKOVITS, L., AND BREZNAI, T.

(*Acta Vet. Acad. Scient. Hung.* 17 183~188, 1967)

ハンガリー各地から送られたCRD罹患鶏160羽につき、病変の程度と大腸菌の関係を調べた。分離した大腸菌は全部で402株で、その血清型は56種に亘り、この他に型別不能株が15%あった。

病変が比較的軽度なものすなわち気のう炎しか認められない場合には、型別不能大腸菌の割合が高く(26.7%)、一方分離される血清型もきわめて多種で、しかもしばしば分離される“主要な血清型”は存在しなかった。気のう炎のほかに腹膜炎あるいは肝包膜炎を併う中度病変では、型別不能株の検出頻度は低(約8%)かった。さらに、心のう炎のほかに腹膜炎、肝包膜炎および心外膜炎を併う重度病変からは、かなり限られた血清型の株が

分離され、型別不能株は検出されなかった。

中度および重度病変から、最もしばしば分離された主要な血清型は078, 087, 035, 095, 074で、これらは中度病変からの分離株の42.2%、重度病変では72.6%となり、病変が重くなるにつれこれら主要な血清型の占める割合が増加する傾向があった。

このほかに比較的検出頻度の高い型として03, 015, 0109, 020, 0141等が挙げられた。

また一般に、鶏群により検出される大腸菌の血清型はかなり特色があるように思われた。

(栃木県家衛研, 村松梅太郎抄)