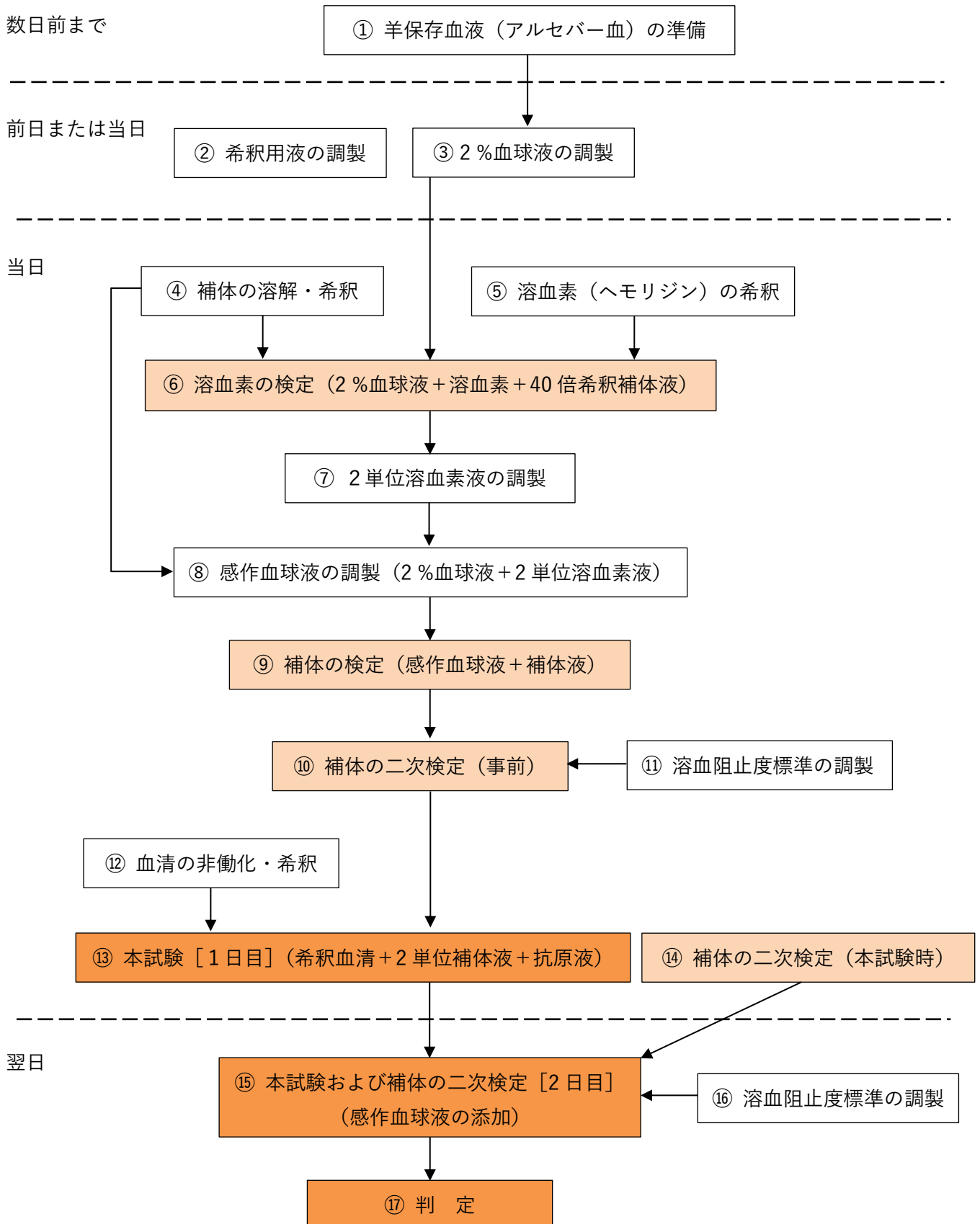


ブルセラ症診断 補体結合反応マニュアル

農研機構 動物衛生研究部門

■ 検査全体の流れ



必要な試薬類

- ・ブルセラ補体結合反応用可溶性抗原 [農業・食品産業技術総合研究機構]
- ・指示陽性血清 (上記の抗原に添付) [農業・食品産業技術総合研究機構]

- ・モルモット補体 [乾燥補体「生研」、デンカ(株)] *
- ・グリーン氏液 [グリーン氏液「生研」、デンカ(株)] *
(乾燥補体の溶解に使用。精製水で溶かしてもよいが、グリーン氏液の方が安定性が増す)
- ・溶血素 (ヘモリジン、抗めん羊血球ウサギ血清) [溶血素「生研」、デンカ(株)] *

- ・希釈用液 (用時調製、滅菌不要。長期保存する場合はオートクレーブ)
- ・羊保存血液 (使用3~4日以上前に無菌的に採血し、直ちに滅菌アルセバー液に混合したもの)
- ・ヘモグロビン定量試薬 [ヘモグロビン B-テストワコー、富士フィルム和光純薬(株)] * (なくても可)

- ・可検血清 (検体) : 1回の試験に5倍希釈で750 μ L = 原液で150 μ L 必要

- * 印の試薬は他社製品でもよいが、本マニュアルは [] 括弧内の製品に適した条件で記載されている。

必要な道具・設備

- ・ガラス試験管 (できるだけ傷がなくきれいなもの。規格をそろえること)
※ポリスチレン製チューブでも可
最低限必要な本数
溶血素 (ヘモリジン) の検定 : 20 本
補体の検定 : 10 本
補体の二次検定 (事前) : 7 本
本試験 : 指示陽性血清用 6 本、可検血清用 1 検体につき 5 本
補体の二次検定 (本試験時) : 7 本
溶血阻止度標準 : 5 本 \times 2 回

- ・15mL チューブ
- ・50mL チューブ (血球の洗浄に用いる。透明度の高いもの。ポリスチレン製を推奨)
- ・ガラスコルベン
- ・ピペット、マイクロピペット、チップ
- ・クラッシュアイス入り保冷容器 (補体、補体を含む液を保冷する)
- ・タイマー

- ・恒温槽 (37 $^{\circ}$ Cおよび56 $^{\circ}$ C設定で使用)
- ・遠心分離機 (スイングローター、試験管が使用できるもの)
- ・冷蔵庫
- ・分光光度計 (なくても可)

① 羊保存血液（アルセバー血）の準備

羊保存血液は最低でも使用する3～4日以上前に採血されたものを用いる（採血後7日程度以降のものより良好な結果が得られる）。

日数が経つと溶血しやすくなるので、1ヶ月以内をめぐりに使用する。（使用前に溶血の有無を確認）
個体あるいは採血時の健康状態等により、血球液が補体結合反応への使用に不適*な場合があるので注意する。

※血球が洗浄時に壊れやすい、あるいは溶血素（ヘモリジン）による溶血が起こりにくい

採血する場合

アルセバー液を少量入れたシリンジを用いて無菌的に採血し、血液量と等量～2倍量のアルセバー液が入った滅菌済み容器に移して、直ちに緩やかに混合する。冷蔵（4℃）保存。

購入する場合

業者から羊保存血液を購入する場合、**日程調整が必要**。

数週間前に発注が必要な場合もあるので、事前に確認しておく。

使用に不適な血液の場合もあるので、複数ロット（採血個体の異なるもの）を購入しておく安心。

アルセバー液の調製

グルコース	2.05 g
塩化ナトリウム (NaCl)	0.42 g
クエン酸ナトリウム	0.80 g
<hr/>	
クエン酸で pH6.1 にする	
蒸留水（メスアップ）	100 mL

ろ過滅菌（0.22 μm フィルター）または 110℃ 10分オートクレーブ滅菌後、冷蔵（4℃）保存。

② 希釈用液（0.01 w/v %硫酸マグネシウム七水和物加生理食塩液）の調製

塩化ナトリウム (NaCl)	8.5 g
硫酸マグネシウム七水和物 (MgSO ₄ · 7H ₂ O)	0.1 g
蒸留水（メスアップ）	1.0 L

すぐに使用する場合は滅菌しなくても可。

長期保存する場合は 121℃ 15分オートクレーブ滅菌後、冷蔵（4℃）保存。

③ 2%血球液の調整

試験に使用する前日または当日に2%血球液を調製する。

(冷蔵保存。溶血がなければ1週間程度使用可)。

1) 羊保存血液を緩やかに転倒混和して混合し、沈殿した血球を浮遊させる。

※ 血球が壊れるので、ボルテックスミキサーは使用しない。

2) 浮遊させた羊保存血液 20 mL ほどを透明な 50 mL チューブにとり、希釈用液を加えて 40~45 mL にする。(羊保存血液 20 mL から作製した 2%血球液で 10 検体を 2~3 回検査できる)

3) 900×g (遠心機のローター径によるが概ね 2000~2500 rpm 程度)、4 °C で 10 分遠心する。血球が舞い上がるのを防ぐため、ブレーキとアクセルは不使用または弱に設定する。

4) 上清とバフィーコートをパスツールピペットまたはアスピレーター (弱設定) 等で丁寧に取り除く。この際、赤血球層を少量吸ってもよいので、バフィーコート (赤血球層の上に白い膜状に見える) をなるべくきれいに取り除くのが重要。

5) この洗浄をさらに 2 回 (計 3 回) くりかえし、最後に沈殿した血球層を中央からゆっくりと吸い上げてとり、希釈用液で 2%血球液を調製する。血球濃度の測定は下記いずれかの方法で行う。

血球濃度の測定法

○パックスセルボリューム法 (分光光度計不要)

血球の体積をマイクロピペットで測定し、希釈用液に 2% となるように浮遊させる方法。

例) 10 mL の 2%血球液を作る場合

15 mL 遠心管の 200 μ L の位置にあらかじめ印を付けておく。この遠心管に入れておいた 9.8 mL の希釈用液に、血球層を中央あたりから 210 μ L とって浮遊させる。(血球 200 μ L だと 2%より薄くなるので、少し多めにとる)

作製した血球液を 900×g で 10 分遠心する。血球層の容量が 2% (200 μ L) 程度になっていることを確認した後、血球を再浮遊させて使用する。

○溶血法 (簡便法)

血球液を溶血させて OD 値を測定し、濃度を予測する方法。分光光度計が必要。

※ OD 値は使用する分光光度計によって多少異なる場合があるので、参考値。

1) 血球層を沈殿の中央から約 1 mL とり、24 mL の希釈用液に浮遊させてストック液 (約 4%) とする。

2) このストック液の一部を希釈用液で 2 倍希釈し、うち 0.1 mL を 0.1%炭酸ナトリウム (蒸留水でも可) 1.4 mL に加えて完全に溶血させ、OD₅₄₀ 値を測定する (2%だと OD₅₄₀ \doteq 0.372)。

3) 測定値をもとにストック液の正確な濃度を計算*し、これを 2% になるように希釈用液で希釈する。

4) 確認のため、作製した 2%血球液を上記と同様に溶血させて OD₅₄₀ 値を測定する。

*計算例) 2 倍希釈したストック液の OD₅₄₀ 値が 0.3534 だった場合

$(0.3534/0.3720) \times 2 = 1.9$ 2 倍希釈したストック液の濃度は 1.9%

→ ストック液の正確な濃度は 3.8%

→ 2%血球液にするには、ストック液を 1.9 倍希釈すればよい

○溶血法（SLS-ヘモグロビン法、最も正確）

ヘモグロビン B テスト-ワコーを使用。分光光度計が必要。

添付の説明書に従いヘモグロビンの検量線を作成して測定するのが正式な方法。2 %羊血球液のヘモグロビン濃度は 0.64 g/dL。説明書の通り 251 倍希釈で測定すると検量線に乗らないので、25 倍希釈で測定する。

以下は略法。

- 1) 溶血法（簡便法）と同様に作製したストック液（約 4 %）の一部を希釈用液で 2 倍希釈し、うち 0.1 mL を 10 倍発色液 2.4 mL と混合し、室温で 3 分おいて溶血させる。
- 2) OD₅₄₀ 値を測定する（2 %だと OD₅₄₀ ≒ 0.153）。以降は溶血法（簡便法）と同様。

以降の作業についての注意事項

- ・補体は温度が上がると失活しやすい。補体を含む液、希釈する液などは常に氷冷しておくこと。希釈列の作製なども氷上で行う。
- ・液量を正確にとるため、氷冷した液をマイクロピペットで吸う際には事前に数回吸引・吐出しを行う。
- ・血球液の希釈・混合時は血球が壊れないよう、ピペッティングやボルテックスを使用せず、試験管をよく振って混合する。
血球のっていない液は、ピペッティングやボルテックスでよく混合する。
- ・血球液を入れて 37 °C で反応させる工程では、血球が沈殿しないようによく攪拌することが重要。攪拌が不十分だと、37 °C 反応終了後に判定をしている間にも溶け残った赤血球の溶血が進んでしまう。

試験管立てを斜めに傾けてしっかり持ち、小刻みに激しく揺すって攪拌する。

試験管立てを水平方向に 180 度回転して（左右を持ち替え）、同様に揺する。

液の温度が下がらないよう、一度の攪拌は 30 秒程度までを目処に行う。

攪拌後、試験管の底を見て血球が沈殿していないかを確認するとよい。沈殿していれば攪拌が不十分。

④ 補体の溶解・希釈

1) 検査当日、乾燥補体 1 バイアルに氷冷しておいたグリーン氏液 1 mL を加えて氷上で完全に溶解し、補体原液とする（冷蔵で 1 週間保存可）。

完全に溶解するには時間がかかるので、最初にこの作業を行う。

2) 補体が完全に溶解したら、溶血素の検定用に 40 倍希釈補体液を作製する。

氷冷しておいた希釈用液 7.8 mL に補体原液を 0.2 mL 加えて混合する。

※ 希釈した補体液は力価が低下しやすいため、調製当日のみ使用可。

⑤ 溶血素（ヘモリジン）の希釈

溶血素（4 °C 保存）10 μL を希釈用液 990 μL に加えて 100 倍に希釈する。

⑥ 溶血素の検定

- 1) 各試験管（10本）に2%血球液を0.25 mLずつ分注する。
- 2) 1)とは別の試験管を用いて、100倍希釈溶血素と希釈用液を下表に従い混合し、希釈列を作製する。

	溶血素の希釈倍数										必要量
	x1000	x2000	x2500	x3000	x3500	x4000	x5000	x6000	x7000	x8000	
100倍希釈 溶血素(mL)	0.10	0.10	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.58 mL
希釈用液(mL)	0.90	1.90	1.20	1.45	1.70	1.95	2.45	2.95	2.76	3.16	20.42 mL

- 3) 1)の血球液の試験管に、2)の溶血素希釈液を0.25 mLずつ加える。加える毎に1本ずつ、すぐによく混合する。
- 4) 蒸発を防ぐためアルミホイルで全体にフタをしてよく攪拌し、37℃の恒温槽で30分反応させる。
血球を沈殿させないよう、10分毎に攪拌する。
- 5) 各試験管に希釈用液を0.5 mLずつ加えて混合する。
- 6) 各試験管に40倍希釈補体液を0.5 mLずつ加えて、すぐによく混合する。
- 7) アルミホイルでフタをして37℃の恒温槽で30分反応させる。
血球を沈殿させないよう、10分毎に攪拌する。
- 8) 恒温槽から取り出し、溶血の有無を確認する。この際、濁りが全くみられない=完全に溶血している
溶血素の最高希釈倍数を1単位とする。(通常1単位は2000~4000倍程度)

※ 37℃30分の反応後では**全て完全溶血しているように見える場合がある**。反応10分で攪拌のために取り出したときに素早く観察し、どの希釈倍数まで溶血しているか、おおよその目処を付けておく方が良い。30分後の判定でも概ね同程度の判断となることが多い。

⑦ 2単位溶血素液の調製

「⑥ 溶血素の検定」の結果から2単位の濃度を計算し、希釈用液を用いて2単位溶血素液を必要量調製する。(1単位が2000倍希釈なら2単位は1000倍希釈。通常2単位は1000~2000倍程度になる)
次項「⑧ 感作血球液の調製」において等量の2%血球液と混合することを考慮して必要量を計算する。

⑧ 感作血球液の調製

- 1) 2%血球液と2単位溶血素液を等量準備し、それぞれ別のガラスフラスコに入れる。
血球液用には大きめのフラスコを使用して、両液混合後の液面の高さが数cmまでとなるようにする。
 - 2) 両液のフラスコをあらかじめ別々に37℃の恒温槽で5分程度温めておく。
(室温でも可。両液を同じ温度にすることが重要)
 - 3) 血球液に溶血素液を数回に分けて加えながら混合する。
※この順(血球液に溶血素液を加える)を逆にしないこと(溶血不十分になるため)。
 - 4) アルミホイルでフタをして37℃の恒温槽で30分反応させる。
血球を沈殿させないよう、最初の1分はフラスコを揺する。その後は10分毎によく攪拌する。
- ※ 感作血球液は氷冷または4℃保存し、感作当日か翌日中に使用する。

必要量

補体検定：5 mL

本試験：指示陽性血清 6本×0.5 mL、可検血清 各5本×0.5 mL

補体二次検定：(7本×0.5 mL) × 2回

= 15 mL + (可検血清の数×2.5 mL)

⑨ 補体の検定

- 1) 下表に従って補体の希釈列を作り、よく混合する。(氷上で行う)

	補体の希釈倍数*										必要量
	×83	×87	×90	×94	×100	×104	×110	×116	×124	×132	
40倍希釈 補体液 (mL)	0.24	0.23	0.22	0.21	0.20	0.19	0.18	0.17	0.16	0.15	1.95 mL
希釈用液 (mL)	0.76	0.77	0.78	0.79	0.80	0.81	0.82	0.83	0.84	0.85	8.05 mL

- 2) 「⑧ 感作血球液の調製」で作製した感作血球液を0.5 mLずつ加え、よく混合する。感作血球液は沈殿しやすいので、時々フラスコを振って攪拌しながら分注する。アルミホイルでフタをしてよく攪拌し、37℃の恒温槽で30分反応させる。血球を沈殿させないよう、10分毎に攪拌する。
- 3) 恒温槽から取り出し、溶血の有無を確認する。この際、濁りが全く見られない=完全に溶血している補体の最高希釈倍数を1単位とする。(通常1単位は94~110倍)

※ 37℃ 30分の反応後では全て完全溶血しているように見える場合がある。反応10分で攪拌のために取り出したときに素早く観察し、どの希釈倍率まで溶血しているか、おおよその目処を付けておくが良い。30分後の判定でも概ね同程度の判断となることが多い。

※ 正式な方法では100倍希釈抗原液0.25 mL/本を同時に入れて反応させる。本マニュアルでは簡便法で実施(100倍希釈抗原液の代わりに希釈用液を使用している)。

表*：本試験では補体液0.5 mL、血清0.25 mL、抗原0.25 mLを混合して反応させる。補体の検定においても本試験と同じ混合比とするため、血清と抗原の代わりに同量の希釈用液を加えている。例えば100倍希釈補体の試験管においては、100倍希釈補体液0.5 mL(40倍希釈補体液0.2 mL+希釈用液0.30 mL)+希釈用液0.5 mL(血清0.25 mL+抗原0.25 mLの代わり)を混合している。

⑩ 補体の二次検定（事前）

「⑨ 補体の検定」（7 ページ）で決定した補体液の力価が正確であることを確認するための試験。
本来は本試験と並行して行うものであるが（⑭ 補体の二次検定（本試験時）（10 ページ））、補体濃度が適切でない場合と本試験のやり直しが必要になる場合があるため、本試験前にも一度、二次検定を行って確認しておくといよい。

1) 必要量の 2 単位補体液を作製する。

（1 単位が 104 倍希釈なら 2 単位は 52 倍希釈。通常 2 単位は 47～55 倍程度）

2) 下表に従って 2 単位補体液と希釈用液を混合し、希釈列を作製する。（氷上で行う）

	補体単位							必要量
	2.0	1.5	1.2	1.0	0.8	0.5	0	
2 単位補体液 (mL)	0.5	0.375	0.3	0.25	0.2	0.125	0	1.75 mL
希釈用液 (mL)	0.5	0.625	0.7	0.75	0.8	0.875	1.0	5.25 mL

3) 補体液希釈列に感作血球液を 0.5 mL ずつ加えてよく混合する。本試験の時（10 ページ「⑮ 本試験 および補体の二次検定 [2 日目]」の 1)) のように補体液と感作血球液を事前に加温する必要はない。

4) アルミホイルでフタをしてよく攪拌し、37 °C の恒温槽で 30 分反応させる。

血球を沈殿させないよう、10 分毎に攪拌する。

5) 恒温槽から取り出した試験管を室温で 900 × g 5 分遠心する。

6) 下記⑪で作製した溶血阻止度標準を用いて、上清を肉眼で比較して溶血阻止度を判定する。

溶血阻止度・溶血阻止スコアについては下記⑪の表を参照。

※ 0.8 単位でほぼ完全溶血（溶血阻止スコア 0）、0.5 単位で溶血阻止度 12.5～25 %（溶血阻止スコア 0.5～1）であることを確認できた場合、その希釈倍数の補体で本試験を実施する。これよりも溶血が強かった場合は「⑨ 補体の検定」（7 ページ）の表の 1～2 段階程度を目安に補体濃度を薄く、溶血が弱かった場合は同様に濃く調製して試験を行う。

※ 事前の二次検定を行ってもなお補体の濃度設定に不安がある場合、可検血清の量に余裕があれば、複数濃度の補体液を用いて本試験および補体の二次検定（本試験時）を行うといよい。

⑪ 溶血阻止度標準の調製

100 % 溶血液と希釈用液を下表のように混合して作製する。

（ ）書きのスコアの標準については作らなくてもよいが、あれば細かい判定がしやすい。

※ 100 % 溶血液：2 % 血球液 1.4 mL + 蒸留水 7.0 mL または 感作血球液 2.7 mL + 蒸留水 5.4 mL

溶血阻止度	0 %		25 %		50 %		75 %		100 %
溶血阻止スコア	0	(0.5)	1	(1.5)	2	(2.5)	3	(3.5)	4
100 % 溶血液 (mL)	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0 mL
希釈用液 (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6 mL

⑫ 血清の非働化

指示陽性血清：1 アンフルに希釈用液 2.5 mL を加えて溶解する（これで5倍希釈血清となる）。

1回の試験で500 μL 使用する。

可検血清：希釈用液で5倍希釈する。1回の試験で5倍希釈血清を750 μL 使用する。

希釈した可検血清と指示陽性血清を56℃の恒温槽で30分間処理して血清中の補体を非働化する。

指示陽性血清は1回分ずつ分注して-20℃で保存する。

⑬ 本試験 [1日目] (希釈血清 + 抗原 + 補体)

1. 抗原の希釈

「ブルセラ補体結合反应用可溶性抗原」のバイアル瓶をよく振って均一にした後、希釈用液を用いて100倍希釈する (=2単位/0.25 mL となる)。

必要量

指示陽性血清 6本 × 0.25 mL、可検血清 各4本 × 0.25 mL
= 1.5 mL + (可検血清の数 × 1.0 mL)

2. 2単位補体液の調製

「⑨ 補体の検定」(7ページ) および「⑩ 補体の二次検定 (事前)」(8ページ) の結果をもとに、希釈用液を用いて2単位補体液を必要量調製する。(1単位が104倍希釈なら2単位は52倍希釈。通常2単位は47~55倍程度)

必要量

本試験：指示陽性血清 6本 × 0.5 mL、可検血清 各5本 × 0.5 mL
補体二次検定 (本試験時)：1.75 mL
= 4.75 mL + (可検血清の数 × 2.5 mL)

3. 可検血清および指示陽性血清の希釈 (氷上)

可検血清は下表に従って、5倍~40倍までの2倍段階希釈を行う。指示陽性血清はラベルに記載された抗体価よりさらに1管高倍数まで希釈する。(記載の抗体価が80倍であれば、160倍まで希釈する)

可検血清では抗原を加えない血清対照 (5倍希釈) を必ず置く (可検血清の抗補体作用の有無を確認するため。抗補体作用については13ページを参照)。

	血清希釈倍数						血清対照 ×5	必要量
	×5	×10	×20	×40	×80	×160		
5倍希釈血清 (mL)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.75 mL
希釈用液 (mL)	--	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	--	

0.25 捨てる

4. 抗原および補体の添加

1) 3. で作製した各 0.25 mL の血清希釈列（可検血清は×5～×40、指示陽性血清は×5～×160）に氷冷した 1. の 100 倍希釈抗原液 0.25 mL を加えてよく混合する。

※ 血清対照には抗原液の代わりに希釈用液 0.25 mL を加える。

2) 全ての試験管に氷冷した 2. の 2 単位補体液を 0.5 mL ずつ加えて、よく混合する。

5. 抗原抗体反応および補体の吸着

試験管全体にアルミホイルでフタをして 4～7 °C で 16～18 時間静置し、反応させる。

⑭ 補体の二次検定（本試験時）

本試験に使用した補体液の力価が 2 単位であったことを確認するための試験。「⑩ 補体の二次検定（事前）」（8 ページ）の 2) と同様に、本試験に使用した 2 単位の補体液と希釈用液を混合し、希釈列を作製する。

	補体単位							必要量
	2.0	1.5	1.2	1.0	0.8	0.5	0	
2 単位補体液 (mL)	0.5	0.375	0.3	0.25	0.2	0.125	0	1.75 mL
希釈用液 (mL)	0.5	0.625	0.7	0.75	0.8	0.875	1.0	5.25 mL

これを本試験の試験管とともに 4～7 °C で 16～18 時間静置し、反応させる。

⑮ 本試験および補体の二次検定 [2 日目]（感作血球液の添加）

1) 感作血球液と全ての試験管（本試験および補体の二次検定）を 37 °C の恒温槽で 5 分加温する。

2) すべての試験管に感作血球液を 0.5 mL ずつ加え、よく混合する。アルミホイルでフタをしてよく攪拌し、37 °C の恒温槽で 30 分反応させる。

血球を沈殿させないように、10 分毎に攪拌する。

⑯ 溶血阻止度標準の調製

「⑪ 溶血阻止度標準の調製」（8 ページ）と同様に作製する。100 % 溶血液には試験で出た完全溶血液を利用してもよい。

※ 100 % 溶血液：2 % 血球液 1.4 mL + 蒸留水 7.0 mL または 感作血球液 2.7 mL + 蒸留水 5.4 mL

溶血阻止度	0 %		25 %		50 %		75 %		100 %
溶血阻止スコア	0	(0.5)	1	(1.5)	2	(2.5)	3	(3.5)	4
100 % 溶血液 (mL)	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0 mL
希釈用液 (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6 mL

⑰ 判定

「⑮ 本試験および補体の二次検定（2日目）（感作血球液の添加）」（10ページ）で30分反応させた試験管を、室温で900×g 5分遠心する。あるいは試験管を4℃条件下で2～3時間静置し、赤血球が液量の半分以上沈降してから判定する。ただし時間をおきすぎると水分の蒸発などにより色に変化する可能性があるので注意する。

「⑯ 溶血阻止度標準の調製」（10ページ）で作製した溶血阻止度標準を用いて、**上清を肉眼で比較して溶血阻止度を判定**する。

★判定基準★

溶血阻止度50%以上（溶血阻止スコア2以上）を示す血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

5倍希釈血清において溶血阻止度50%以上（溶血阻止スコア2以上）すなわち抗体価5倍以上を示す可検血清を補体結合反応陽性、溶血阻止度50%未満（溶血阻止スコア2未満）すなわち抗体価5倍未満を示すものを陰性とする。

ただし、5倍希釈血清において溶血阻止スコア2未満であっても、10倍希釈以上で溶血阻止スコア2以上であった場合は、プロゾーン現象（13ページ参照）の可能性がある。また、血清対照で溶血阻止が認められた場合、その血清には抗補体作用（13ページ参照）があると判断される。

★試験成立条件★

指示陽性血清がラベルに記載されている抗体価を示していること。記載の抗体価が「80倍」の場合、80倍希釈で溶血阻止スコア2以上かつ160倍希釈で溶血阻止スコア2未満を示していればよい。

※ 2022年4月現在使用可能な製品ロットでは、指示陽性血清の抗体価は80倍（80倍希釈でスコア4程度になるよう調製されている）

★補体の二次検定★

1.0単位で完全溶血（上清の溶血阻止スコア0、赤血球沈殿なし）、0.8単位で上清の溶血阻止スコアは0かつ沈殿にはわずかに赤血球が残り、0.5単位では溶血阻止スコア1.5～3.0となればよい。1.2単位で赤血球の沈殿があるようだと補体濃度の力価が少し弱い。

※ 補体の力価は4℃で一夜反応させることで85%程度に低下するため、「⑩ 補体の二次検定(事前)」とは判定基準が異なる。

※ 補体力価が過剰だった場合には溶血が強く、不足している場合には溶血が弱くなるため、指示陽性血清の抗体価がラベル記載の値を示さず、試験不成立となる可能性がある。

参考資料

1. ブルセラ症診断 補体結合反応の判定基準

5倍希釈した可検血清において

溶血阻止度 50%未満（溶血阻止スコア 2 未満）であるもの = 抗体価 5 倍未満 = 陰性

溶血阻止度 50%以上（溶血阻止スコア 2 以上）であるもの = 抗体価 5 倍以上 = 陽性

抗補体作用があり、溶血阻止スコア 2 以上であるもの = 判定不能（陰性でない）

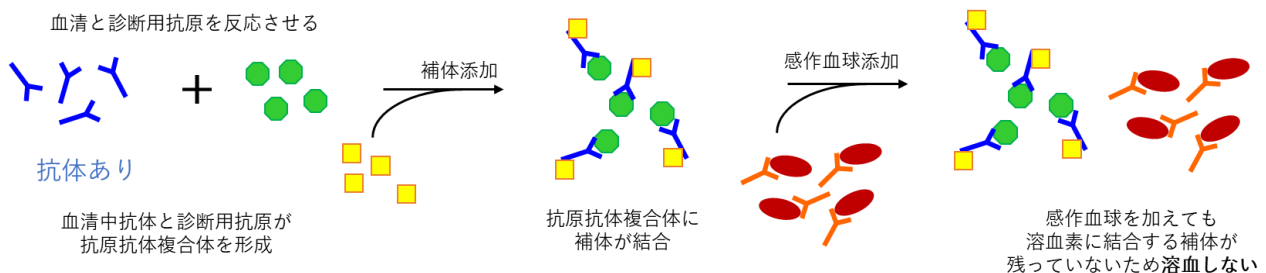
2. 各試薬（2 ページに記載の製品）の詳細と検査可能頭数

- ① 抗原 : ブルセラ・メリテンシスの可溶性抗原液、5 mL 入り、1 本で 400 頭分
- ② 指示陽性血清 : 凍結乾燥、2.5 mL 分、4～5 回分（1 回 0.5 mL 使用する）
- ③ 溶血素(ヘリジン) : 羊赤血球に対するウサギ免疫血清（非働化済み）、3 mL 入り。
希釈して使用するため、相当回数使用できる
- ④ 補体 : 凍結乾燥 10 バイアル瓶/箱、1 瓶 1 mL 分。
グリーン氏液溶解後の保存は冷蔵で 1 週間まで。
10 検体程度の試験 1 回で概ね 1 瓶を使いきる。

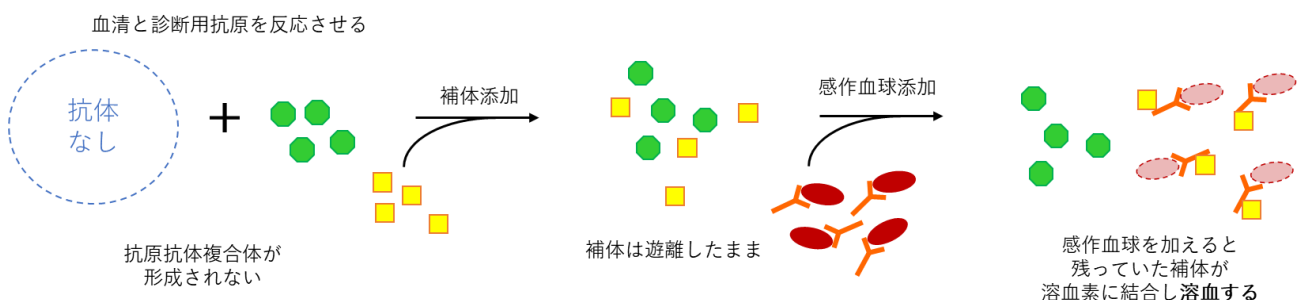
3. 補体結合反応の原理



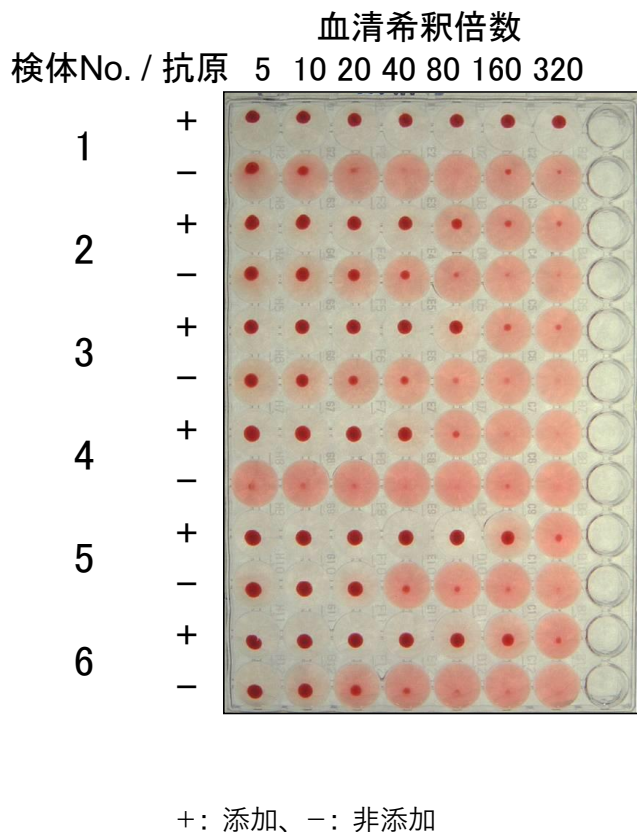
可検血清中に抗ブルセラ抗体があると



可検血清中に抗ブルセラ抗体がないと



4. ブルセラ補体結合反応における抗補体作用

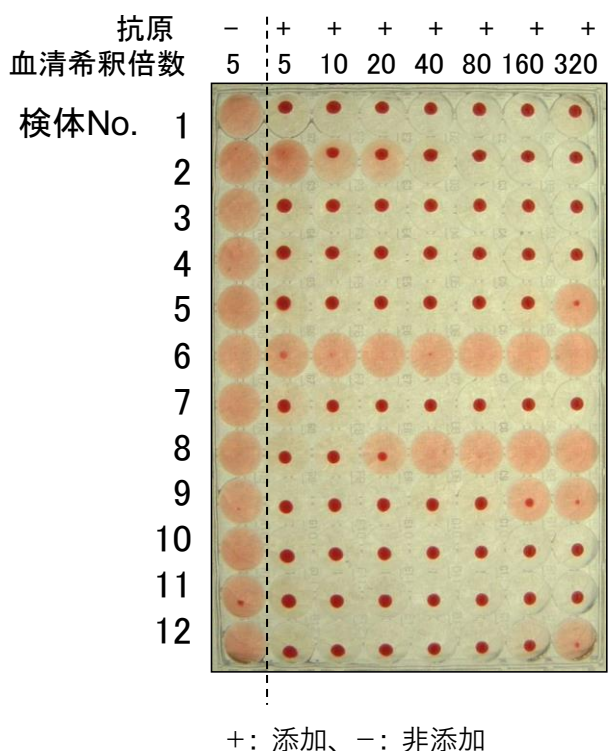


検体 No. 1~6 では抗原を加えなくても溶血阻止が認められる。このような現象を血清の抗補体作用という。血清中に別の抗原抗体反応産物があること等が原因と考えられている。

ブルセラ補体結合反応用可溶性抗原の使用説明書では、5 倍希釈血清で血清の抗補体作用を確認するよう記載されている。抗補体作用がある血清においては、5 倍希釈で溶血阻止スコア 2 未満を示す場合には陰性と判定して差し支えないが、溶血阻止スコア 2 以上を示す場合については判定ができないため、結果は「陰性でない」となる。

左図は抗補体作用を認めた検体で、血清希釈列を 2 列作り、1 列は抗原を加え、もう 1 列は抗原の代わりに希釈用液を加えて反応を行ったものである。多くの場合、抗原を加えない列よりも抗原を加えた列で溶血阻止反応が強くなる。この差が大きい場合は陽性、無いもしくは小さい場合は陰性の可能性があるが、判定はできない。

5. ブルセラ補体結合反応におけるプロゾーン現象



検体 No. 2 は 5 倍希釈血清で完全溶血しているが、希釈倍数が上がると溶血阻止度が高くなり、40 倍希釈以上では完全溶血阻止が認められる。このような現象をプロゾーン現象という。血清中に補体結合反応には関与しない IgG2 抗体の比率が高い場合、これが抗原に結合することで IgG1 抗体の反応を阻害することが原因と考えられる。

5 倍希釈血清の結果のみを見て判定を行うと、No. 2 のようにプロゾーン現象を示す血清を陰性と判定してしまうことになるので、「ブルセラ補体結合反応用可溶性抗原」の使用説明書に記載の通り、必ず 5 倍から 40 倍まで血清を希釈して試験を行い、全ての試験管の結果を見て判定を行うこと。

ブルセラ症診断 補体結合反応 工程記録表

1) 希釈用液 (0.01 w/v %硫酸マグネシウム七水和物加生理食塩液) の調製

調製日: / /

- 塩化ナトリウム 8.5 g ロット等
- 硫酸マグネシウム七水和物 0.1 g ロット等
- 蒸留水 1000 mL

121 °C 15分

4 °C保存

2) 2%羊血球液の調製

調製日: / /

血液 (採血日: / / 、ロット等)

- 希釈用液で 回遠心洗浄
- 血球層の中央から mL + 希釈用液 mL = mL

【溶血法】

- 2倍希釈ストック液 OD₅₄₀ = → ストック液血球濃度 %
- ストック液 mL + 希釈用液 mL (倍希釈)
- 2%血球液 OD₅₄₀ =

3) 溶血素 (ヘモリジン) の検定

検定日: / /

溶血素 (開封日: / / 、ロット等)

補体 (開封日: / / 、ロット等)

グリーン氏液 (開封日: / / 、ロット等)

- 100倍希釈溶血素: 原液 μL + 希釈用液 mL = mL
- 40倍希釈補体: 補体 mL + 希釈用液 mL = mL

溶血素の希釈倍数									
×1000	×2000	×2500	×3000	×3500	×4000	×5000	×6000	×7000	×8000

⇒ 1単位 倍 → 2単位 倍

4) 感作血球液の調製

調製日： /

2%血球液： _____ mL (作成日 /)

_____ 倍希釈溶血素：

溶血素原液 _____ μ L + 希釈用液 _____ mL = _____ mL

↓
37 °C 30 分 (10 分毎に攪拌)

5) 補体の検定

検定日： /

40 倍希釈補体：3) で作成したもの

補体の希釈倍数									
× 83	× 87	× 90	× 94	× 100	× 104	× 110	× 116	× 124	× 132

⇒ 1 単位 _____ 倍 → 2 単位 _____ 倍

6) 補体の二次検定 (事前)

検定日： /

2 単位補体液の調製 (2 単位： _____ 倍)

_____ 倍希釈補体：補体原液 _____ μ L + 希釈用液 _____ mL = _____ mL

☆補体二次検定 (事前) 判定表☆

単位	2.0	1.5	1.2	1.0	0.8	0.5	0
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---

→ 2 単位 _____ 倍

7) 溶血阻止度標準の調製

100%溶血液：2%血球液 1.4 mL + 蒸留水 7 mL = 8.4 mL

☆本試験

8) ① 血清の準備

指示陽性血清：(溶解日： / / 、ロット等)

希釈用液 2.5 mL で溶解 (× 5)、56 °C 30 分非働化

- 可検血清： 1. _____ 非働化
2. _____ 非働化
3. _____ 非働化
4. _____ 非働化
5. _____ 非働化

希釈用液で 5 倍希釈して、56 °C 30 分非働化

② 血清の希釈

	指示陽性血清の希釈倍数					
	× 5	× 10	× 20	× 40	× 80	× 160
5 倍希釈血清：	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
希釈用液：	-	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25

0.25 mL 捨てる

	可検血清の希釈倍数				血清対照
	× 5	× 10	× 20	× 40	
5 倍希釈血清：	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
希釈用液：	-	0.25	0.25	0.25	-

0.25 mL 捨てる

③ 100 倍希釈抗原の調製

抗原 (開封日： / / 、ロット等)

100 倍希釈抗原：抗原原液 _____ μL + 希釈用液 _____ mL = _____ mL

④ 2 単位補体液の調製 (2 単位： _____ 倍)

_____ 倍希釈補体：補体原液 _____ μL + 希釈用液 _____ mL = _____ mL

9) 補体の二次検定 (本試験時)

検定日: / /

倍希釈補体: 8) ④で調製したもの

↓
4 °C 16~18 時間 (反応開始時間 / / , :)

1 0) 判定 (開始時間 / / , :)

37 °C 5 分加温

感作血球液: 4) で調製したもの 0.5 mL ずつ

↓
37 °C 30 分 (10 分毎に攪拌)

1 1) 溶血阻止度標準の調製

100 %溶血液: 2 %血球液 1.4 mL + 蒸留水 7 mL = 8.4 mL

☆本試験判定表☆

血清の希釈倍数					
× 5	× 10	× 20	× 40	× 80	× 160

指示陽性血清:

可検血清	血清の希釈倍数				血清対照
	× 5	× 10	× 20	× 40	

1 :

2 :

3 :

4 :

5 :

☆補体二次検定判定表☆

単位	2.0	1.5	1.2	1.0	0.8	0.5	0
----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	---