

ブルセラ症診断 補体結合反応マニュアル 図解

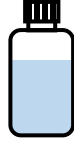
農研機構 動物衛生研究部門

③ 2%血球液の調整

○ 血球液の洗浄

！注意！ 血球が壊れるので
ポルテックスミキサーは使用しない

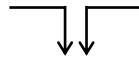
希釈用液



羊保存血液



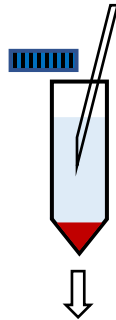
ゆるやかに転倒混和して
均一な浮遊液とする



透明な50 mL遠心管に羊保存血液を必要量とり、希
釈用液で40~45 mLにメスアップ
(羊保存血液20 mLで10検体を2~3回検査可能)



900 × g (2000~2500 rpm) 4 °Cで 10分間 遠心
アクセル・ブレーキは弱 or OFF



血球層の上の白い膜
(バフィーコート)を
取り除きながら上清を捨てる

血球層の上の白い膜を
しっかり取り除く



洗浄操作を
計3回繰り返す

希釈用液で40~45 mLにメスアップし再浮遊させる



900 × g 4 °Cで 10分間 遠心
アクセル・ブレーキは弱 or OFF



上清を捨てる

血球層を中央からとって使用

○ 血球濃度の測定

洗浄・上清除去後の
血球液



・ 溶血法

・ パックドセルボリューム法

血球層を中央から適量とり
希釈用液で25倍希釈する

例) 血球 1 mL + 希釈用液 24 mL

||

血球層を中央から適量とり
希釈用液で50倍希釈する

(計算上ぴったりの量で
作製すると2%より薄くなるので
血球の量を若干多めにする)



ストック液 (約4%) ★



ストック液を一部とり
希釈用液で2倍希釈する



例) 10 mL作製する場合
あらかじめ200 μ Lの位置に
印を付けた15 mL遠心管を使用
希釈用液 9.8 mL + 血球210 μ L

簡便法



2倍希釈ストック液で
溶血液を作製する

2倍希釈ストック液 0.1 mL
0.1%炭酸Na液 or 蒸留水 1.4 mL



分光光度計で測定
2%であれば $OD_{540} \approx 0.372$



測定値をもとにストック液★を
正確に2%になるよう希釈する
(希釈後のOD値を再確認する)

SLS-
ヘモグロビン法



ヘモグロビンB-テストワコー

2倍希釈ストック液 0.1 mL
10倍発色液 2.4 mL



室温で3分おいてから
分光光度計で測定
2%であれば $OD_{540} \approx 0.153$



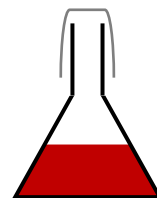
900 \times g 4 $^{\circ}$ C 10分間 遠心
アクセル・ブレーキは弱 or OFF



血球層の容量が
2% (200 μ L) 程度に
なっていることを確認



再浮遊させて使用



2%血球液

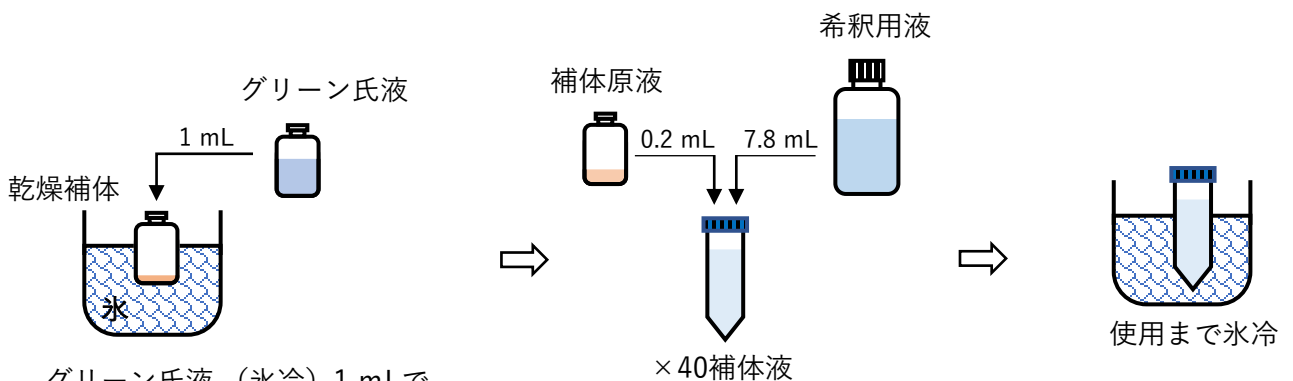
(氷冷または4 $^{\circ}$ C保存、1週間ぐらいまで使用可能)

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。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。**
血球の入っていない液は、ピペッティングやボルテックスでよく混合。
- 血球を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、試験管の底を確認してみて、血球が沈殿していたら攪拌が不十分。

④ 補体の溶解・希釈



グリーン氏液（氷冷）1 mLで完全に溶解させる

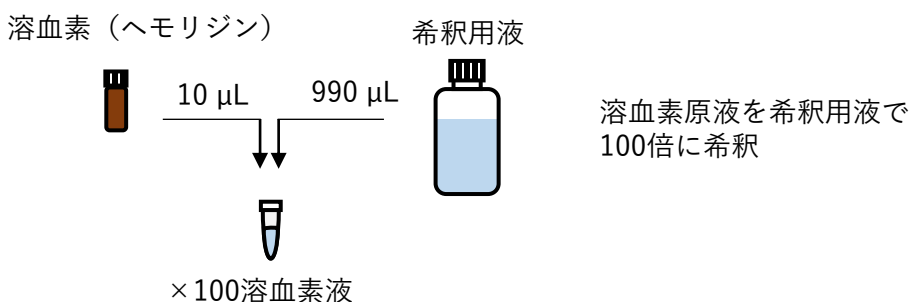
※ 溶解には時間がかかるので当日の最初の作業として行う

希釈用液（氷冷）で40倍希釈

希釈した補体液は当日のみ使用可

！注意！
補体は常に氷冷

⑤ 溶血素（ヘモリジン）の希釈



⑥ 溶血素の検定

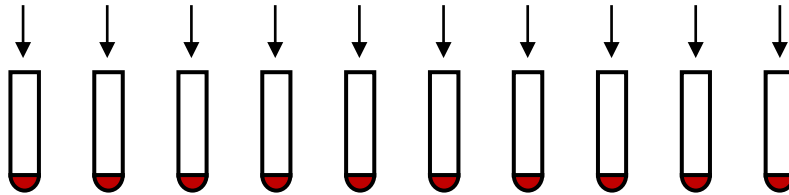
ポイント

・反応時は血球が沈殿しないようによく攪拌

- 1) 2%血球液を0.25 mLずつ試験管に分注
- 2) 1) とは別の試験管で、100倍希釈溶血素液と希釈用液を用いて溶血素液の希釈列を作製

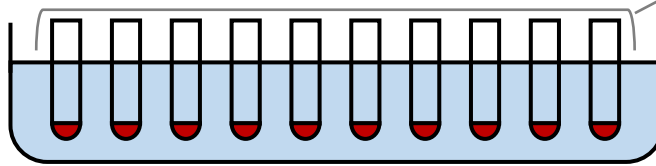
	溶血素の希釈倍数										必要量
	x1000	x2000	x2500	x3000	x3500	x4000	x5000	x6000	x7000	x8000	
100倍希釈 溶血素(mL)	0.10	0.10	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.04	0.58 mL
希釈用液 (mL)	0.90	1.90	1.20	1.45	1.70	1.95	2.45	2.95	2.76	3.16	20.42 mL

- 3) 1) の2%血球液に
2) の溶血素希釈液
0.25 mLを加える。
1本毎に混合

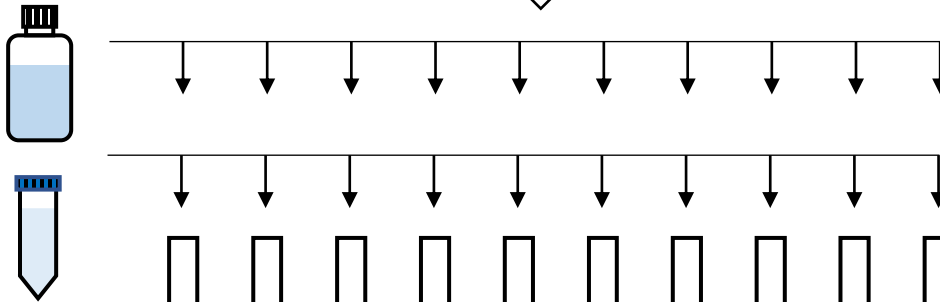


すぐによく攪拌 ↓

- 4) 恒温槽37°C
30分



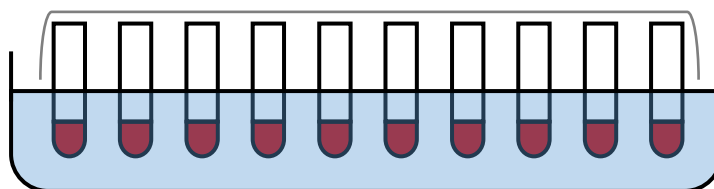
- 5) 希釈用液0.5 mL
ずつ加えて混合



- 6) 40倍希釈補体
0.5 mLずつ加える

すぐによく攪拌 ↓

- 7) 恒温槽37°C
30分



10分毎の攪拌時に
溶血の様子を観察しておく

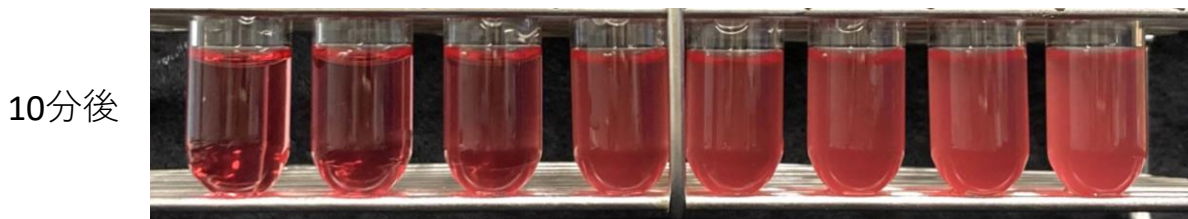
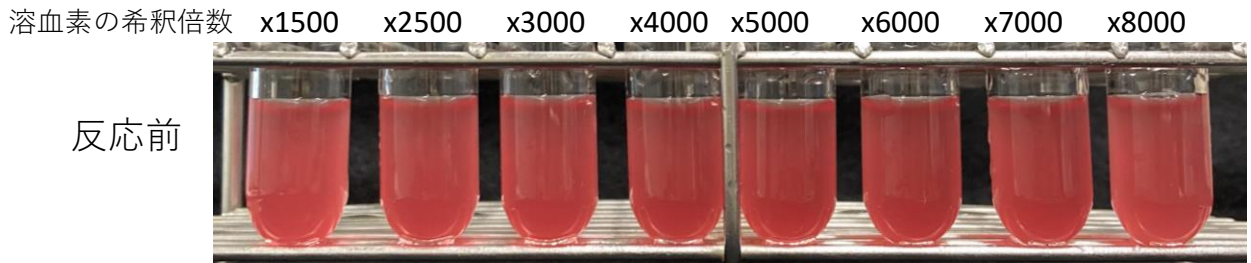
- 8) 30分反応後、濁りのみられない=完全溶血している最高希釈倍数を1単位とする
2単位の濃度に調製した溶血素液を用いて感作血球液を作製する
例) 1単位が2000倍希釈なら2単位は1000倍希釈

参考) ⑥ 溶血素の検定 (実施例)

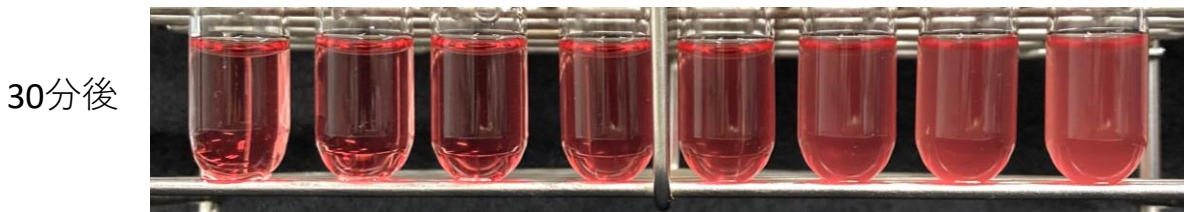
注：マニュアル記載の方法とは溶血素の希釈倍数が異なる

攪拌のために10分毎に恒温槽から取り出す際に観察し、判定の目処を付けておくが良い。

+：濁りあり -：濁りなし（完全溶血）



判定 - - ± + + + + +



判定 - - - + + + + +

↑
x3000を
1単位と判断

x3000 x4000 x5000



-



+

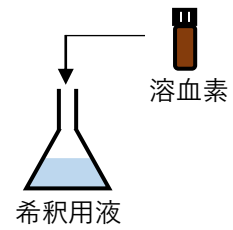


+

くっきり印刷された文字などを透かしてみると濁りの有無が分かりやすい。

⑦ 2単位溶血素液の調製

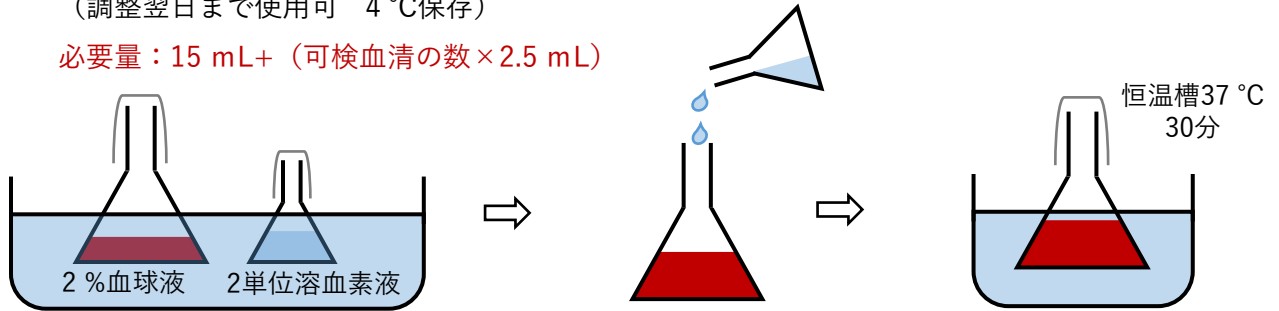
溶血素原液を希釈用液で希釈して、2単位溶血素液を調製
例) 1単位が2000倍希釈なら2単位は1000倍希釈



⑧ 感作血球液の調製

補体の検定・二次検定、本試験に使用
(調整翌日まで使用可 4℃保存)

必要量: 15 mL+ (可検血清の数 × 2.5 mL)



等量の2%血球液と2単位溶血素液を
同じ温度にする(恒温槽37℃5分)

血球液に溶血素液を
少しずつ加えながら混合
※入れる順を逆にしないこと

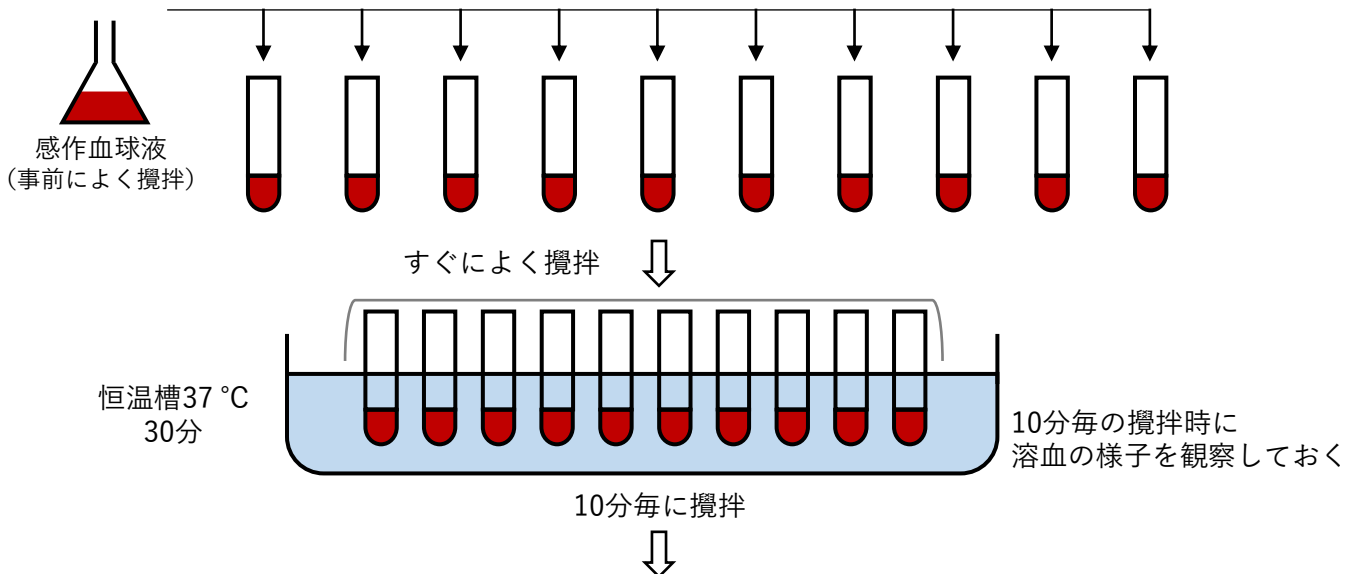
最初の1分間はしっかり攪拌
その後10分毎に攪拌
→ 使用まで氷冷または4℃保存

⑨ 補体の検定

1) 40倍希釈補体液を用いて、補体液の希釈列を作製(氷上) 各1.0 mL

	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) 補体希釈液に感作血球液を
0.5 mLずつ加えて混合



3) 30分反応後、濁りのみられない=完全溶血している最高希釈倍率を1単位とする
本試験には2単位の濃度に調製した補体液を使用

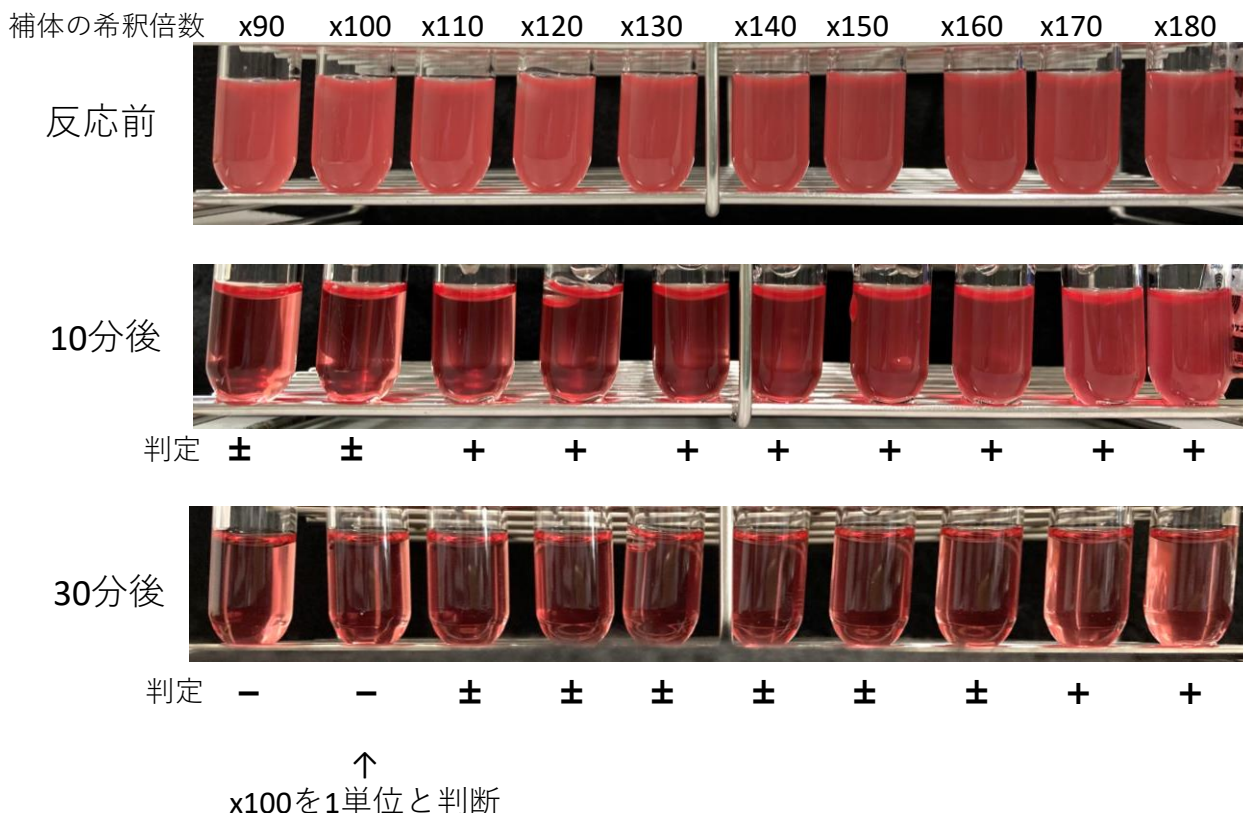
例) 1単位が100倍希釈なら2単位は50倍希釈

参考) ⑨ 補体の検定 (実施例)

注：マニュアル記載の方法とは補体の希釈倍数が異なる

攪拌のために10分毎に恒温槽から取り出す際に観察し、判定の目処を付けておくと良い。

+：濁りあり -：濁りなし（完全溶血）



補体の検定では、ほとんど全ての希釈倍数で完全溶血しているように見える、各希釈倍数間で溶血の程度の差が小さく分かりにくい等で、どこまでを完全溶血とするかの判断が難しいことがある。

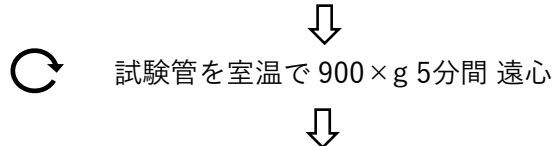
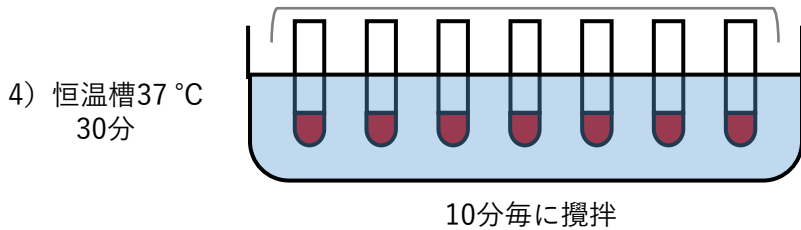
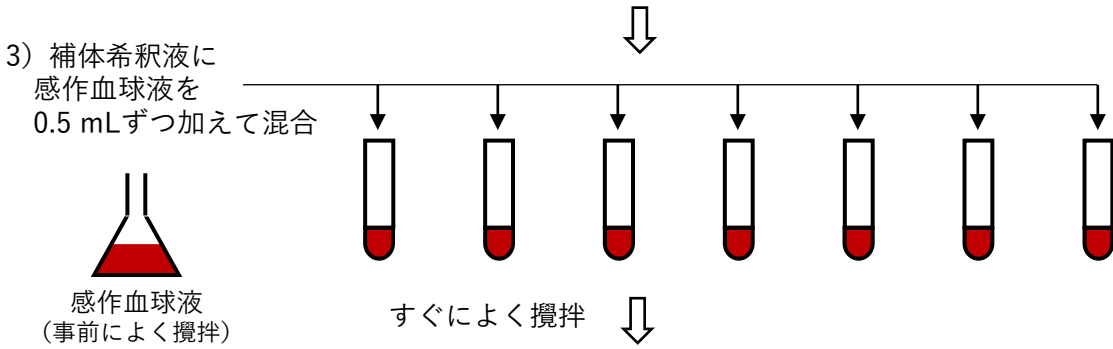
→ 本試験時の補体濃度が適切でないときやり直しが必要になる場合があるため、本試験前に「⑩ 補体の二次検定 (事前)」を実施して、正確な補体の力価をあらかじめ確認しておくことを推奨。

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「⑬ 本試験」および「⑭ 補体の二次検定 (本試験時)」を行ってもよい。

⑩ 補体の二次検定 (事前)

- 1) 必要量の2単位補体液を作製する。(氷上) 例) 1単位が100倍希釈なら2単位は50倍希釈
- 2) 2単位補体液を用いて下表に従い補体液の希釈列を作製 各1.0 mL

	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



5) 上清の色を⑪の溶血阻止度標準と比較して判定する

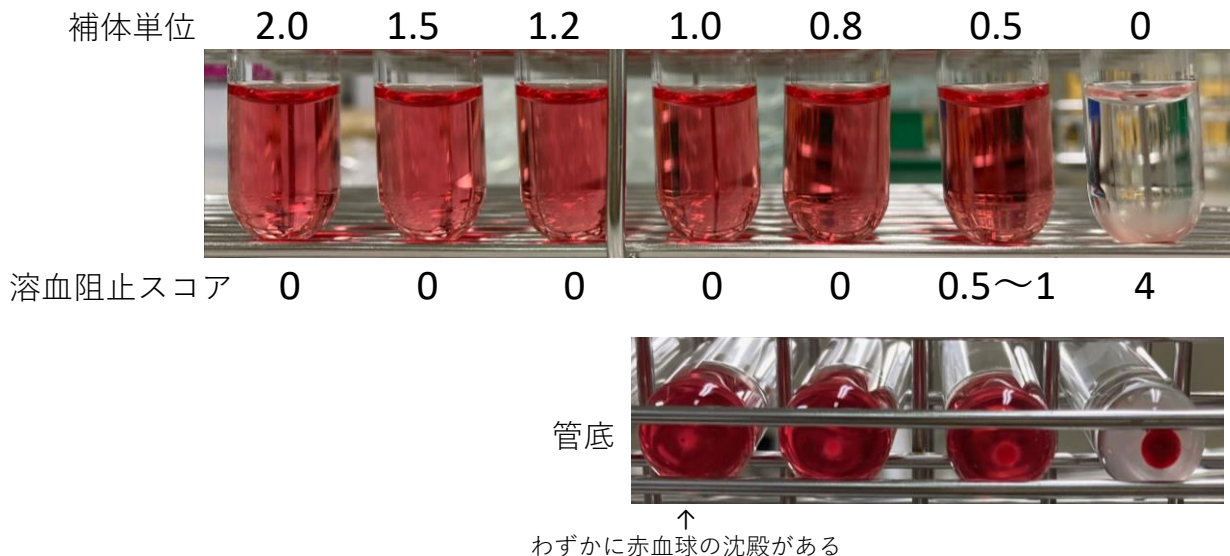
⑪ 溶血阻止度標準の作製

100%溶血液と希釈用液を混合して作製
 100%溶血液：2%血球液 1.4 mL + 蒸留水 7.0 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
希釈用液 (mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6

() 書きのスコアの標準は無くてもよい

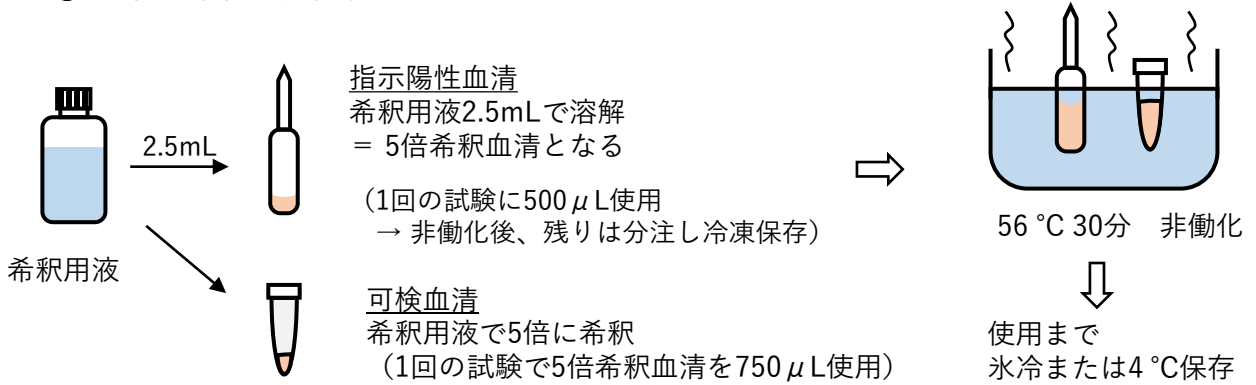
参考) ⑩ 補体二次検定 (事前) 実施例



0.8単位でほぼ完全溶血（溶血阻止スコア0）、
0.5単位で12.5～25%溶血阻止（溶血阻止スコア0.5～1）であればよい。
これよりも溶血が強かった場合は補体濃度を「補体の検定」（6ページ）の表の
1～2段階程度を目安に薄く、弱かった場合は同様に濃く調製して試験を行う。

上記写真の例では、1.0～0.8単位で上清の溶血阻止スコア0であるが、
1.0単位でもわずかに赤血球の沈殿が認められるため、補体力価はやや低いと判断。

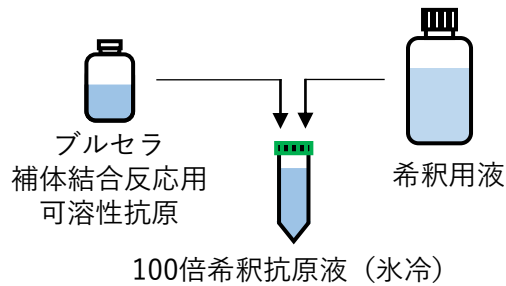
⑫ 血清の希釈・非働化



⑬ 本試験 (1日目)

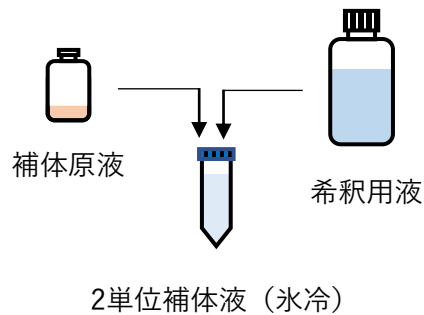
1) ブルセラ補体結合反应用可溶性抗原を希釈用液で100倍希釈する

必要量：1.5 mL+ (可検血清の数 \times 1.0 mL)



2) 補体原液を希釈用液で希釈して2単位補体液を調製
例) 1単位が100倍希釈なら2単位は50倍希釈

必要量：4.75 mL+ (可検血清の数 \times 2.5 mL)



3) 希釈用液を用いて可検血清および指示陽性血清の希釈列を作製 (氷上)
(各0.25 mL、可検血清は \times 40まで)

	血清希釈倍率						血清対照 \times 5	必要量
	\times 5	\times 10	\times 20	\times 40	\times 80	\times 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	--	

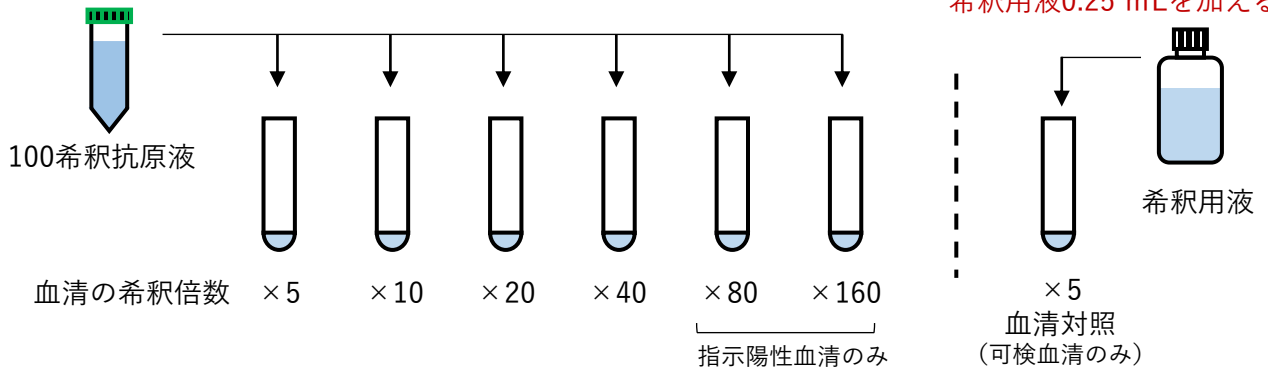
0.25 mL捨てる

⑬ 本試験（1日目）つづき ※氷上で作業

！注意！
⑭ 補体の二次検定を必ず同時に行うこと

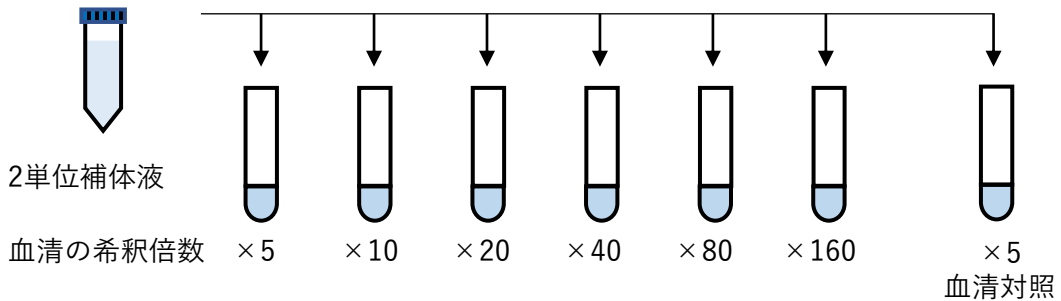
4) 100倍希釈抗原液0.25 mLを加える（血清対照以外の試験管）

5) 血清対照には抗原液ではなく希釈用液0.25 mLを加える



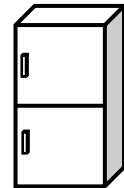
よく混合する ↓

6) すべての試験管に2単位補体液0.5 mLを加える



よく混合する ↓

4~7℃ 16~18時間静置



⑭ 補体の二次検定（本試験時）

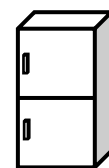
1) 2単位補体液を用いて補体液の希釈列を作製（氷上） 各1.0 mL

	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



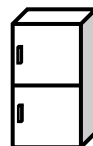
本試験の試験管と一緒に

4~7℃ 16~18時間静置



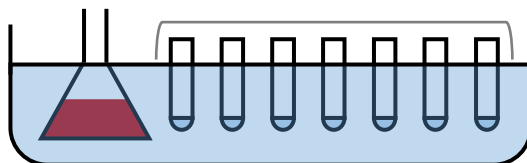
⑮ 本試験および補体の二次検定（2日目）

4～7℃ 16～18時間静置

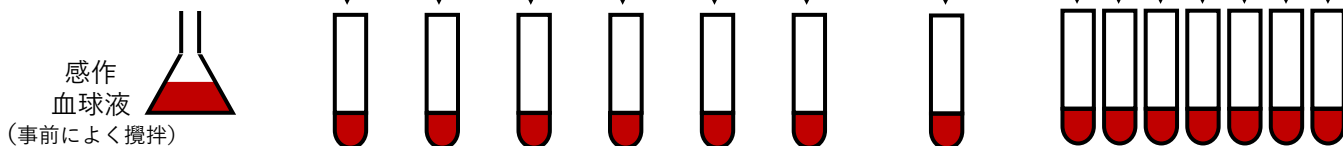


！注意！
補体の二次検定を必ず同時に行うこと

1) 感作血球液とすべての試験管を同じ温度にする
(恒温槽37℃ 5分)



2) すべての試験管に感作血球液を0.5 mLずつ加えて混合



血清の希釈倍数 ×5

×10

×20

×40

×80

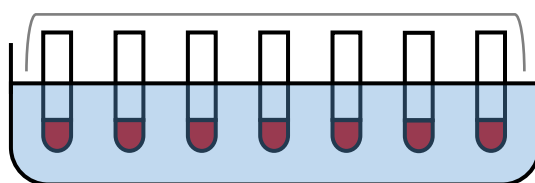
×160

×5 血清対照

補体の二次検定

すぐによく攪拌

恒温槽37℃ 30分



10分毎に攪拌

3) 室温で900×g 5分間遠心 または 4℃で2～3時間静置して血球を沈降させる

溶血阻止度標準と上清の色を比較して判定する

⑯ 溶血阻止度標準の作製

100%溶血液と希釈用液を混合して作製（試験で出た完全溶血液を使用しても可）

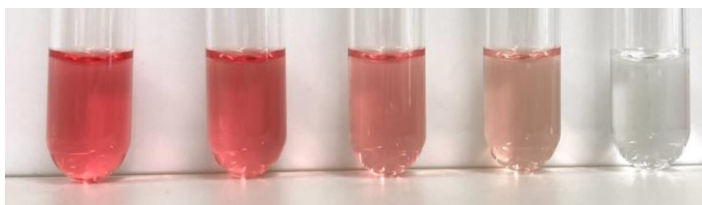
100%溶血液：2%血球液 1.4 mL + 蒸留水 7.0 mL

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
希釈用液(mL)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.2	1.4	1.6

() 書きのスコアの標準は無くてもよい

⑰ 判定

溶血阻止度標準



溶血阻止スコア	0	1	2	3	4
溶血阻止度	0%	25%	50%	75%	100%

指示陽性血清

血清の希釈倍数 x5 x10 x20 x40 x80 x160



溶血阻止スコア 4 4 4 4 3~4 0

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。

例) ラベル記載の抗体価が「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未満であること。

※2022年4月現在使用可能な製品ロットの抗体価は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）

可検血清（陰性）

血清の希釈倍数 x5 x10 x20 x40 血清対照(x5)



溶血阻止スコア 0 0 0 0 0

50%溶血阻止（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倍希釈血清で50%溶血阻止（溶血阻止スコア2）以上を示すもの = 抗体価5倍以上 = **陽性**

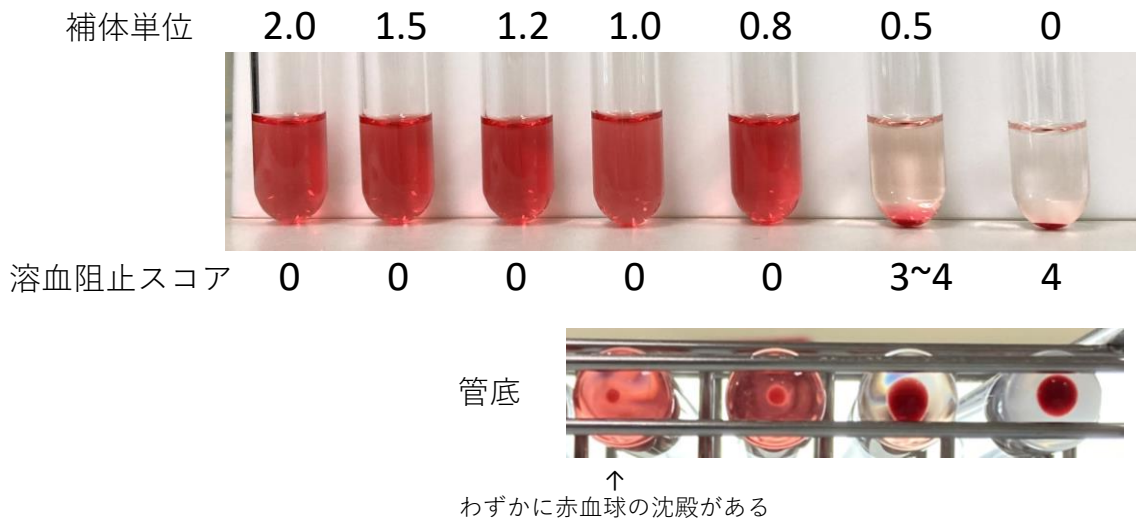
5倍希釈血清で50%溶血阻止（溶血阻止スコア2）未満を示すもの = 抗体価5倍未満 = **陰性**

抗補体作用（血清対照で溶血阻止）があり、溶血阻止スコア2以上のもの
= **判定不能（陰性でない）**

5倍希釈血清で50%溶血阻止（溶血阻止スコア2）未満でも、
10倍希釈以上で溶血阻止スコア2以上である場合は、プロゾーン現象の可能性はある。

（抗補体作用、プロゾーン現象についてはマニュアル13ページ参照）

参考) ⑭ 補体二次検定 (本試験時) 実施例



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単位でも赤血球の沈殿があるようだと補体力価が低い。

上記写真の例では、1.0および0.8単位で上清の溶血阻止スコア0、
1.0単位で沈殿にわずかに赤血球が見られるため、補体力価はやや低いと判断。