

# ニューカッスル病の赤血球凝集抑制試験の精度に関する要因と エライザ導入の検討

中央家畜保健衛生所

和食雄一 弥田進 宮島柁生 濱田英莉 馬上斉 小林淳彦

## 背景

新潟県では、ニューカッスル病 (ND) のワクチン抗体の保有状況を把握するため、赤血球凝集抑制 (HI) 試験 (「ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集素」: 明治アニマルヘルス株式会社 を使用) を実施している。現行では、1 農場あたり 10 羽の HI 価の幾何平均 (GM) を算出し、GM10 以上を目安として発症防御可能と判断している。

HI 試験の手法は「ND 検査手順書」(手順書) を作成し、全県で統一済みである。しかし、5 農場 50 検体について異なる家保で HI 試験を実施したところ、同一検体で 2 管以上成績が異なる検体を多数確認した。また、家保によって、同一農場の GM が 10 未満または 10 以上となり、発症防御可否の判定に不一致が生じた。同じ家保内でも検査員が異なると同様に成績に相違を生じた。(表 1)

表 1 家保・検査員による成績の相違の例

★家保による相違				★検査員による相違				
農場No.	家保	2管以上成績が異なった検体	農場のGM	農場No.	家保	検査員	2管以上成績が異なった検体	農場のGM
I	a	7検体/10検体	8.7	II	a	ア	5検体/10検体	5.4
	b		24.6					アイ
II	a	4検体/10検体	5.4	V	c	ウ	8検体/10検体	226.3
	b		14.1					42.9
III	a	4検体/10検体	3.5					
	b		9.3					
	c		9.3					
IV	a	8検体/10検体	5.4					
	b		28.3					
	c		28.3					

■ GMでの発症防御可否の判定が不一致

そこで、HI 試験の精度に関する要因を考証し、その改善策を模索した。

## 検証 1

上記 HI 試験では、家保により使用する赤血球浮遊液 (RBCs) の供血鶏種が異なっていた。そこで、ジュリア (JL)、ボリスブラウン (BB)、名古屋種 (N) の RBCs を用いて、同一の 111 検体について HI 試験を実施した。JL vs BB、JL vs N、BB vs N で成績を比較したところ、それぞれ 14 (12.6%)、16 (14.4%)、31 (27.9%) 検体で相違を認めた。さらに、JL vs BB で相違を認めた 14 検体中 12 検体で BB が高値を示した。同様に、JL vs N では 16 検体中 14 検体で JL が、BB vs N では 31 検体中 30 検体で BB が高値を示した。また、全 111 検体の GM は JL:16.6、

BB:21.0、N:12.1 となり、総じて  $N < JL < BB$  の順に成績が高値を示すように思われた。

以上から、供血鶏種により成績に相違が生じる可能性が示唆された。これは、他鶏種を用いているが、村野らの報告 [2] と一致する。

## 検証 2

同一鶏種であれば、どの個体の RBCs を用いても同様の成績が得られるか検証した。供血個体はすべて JL とし、A 農場の同一ロットである 4 羽 (A-1、A-2、A-3、A-4:151 日齢) 及び B 農場の 1 羽 (B:474 日齢) を用いた。10 検体について、この 5 羽の RBCs を使用して HI 試験を実施した結果、特に A-1~4 vs B を比較した場合に相違を多数認めた。(表 2)

表 2 各供血個体間の成績の相違

供血個体	検体No.										GM
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
A-1	160	160	160	320	320	640	640	160	80	160	226.3
A-2	320	640	320	640	640	320	640	320	80	320	367.6
A-3	160	320	80	320	320	640	320	80	40	40	160.0
A-4	320	320	160	320	1280	1280	640	160	80	640	367.6
B	80	80	40	160	320	160	160	80	80	160	113.1

■ Bと相違を生じた検体

以上から、鶏種のみならず、供血個体によっても成績に相違を生じる可能性が示唆された。これについても、先ほどの報告 [2] に同様の結果が示されている。今回は特に農場が異なる供血個体を用いた場合に顕著となった。

## 検証 1 と検証 2 のまとめ

ND の感染・発症防御に要する HI 価は、多くの文献上 [3] [4] [5]、WOAH の手法 [6] により導出されている。その手法には RBCs の供血鶏種の条件は記載されておらず、供血個体として SPF 鶏もしくはワクチンフリーの ND 抗体を持たない個体を用いることが推奨されている。また、検証 2 では供血個体が飼養されている農場のワクチンプログラムや日齢が異なっているため、供血個体自体の HI 価が異なっていた可能性がある。以上から、供血個体自体の HI 価が成績に影響する可能性が考えられる。

### 検証 3

HI 試験の判定時にはマイクロプレートを傾け、管底の赤血球が流れる速度を観察し、その速度が血清対照と同等の場合を完全凝集抑制とする[7]。

しかし、491 検体の HI 試験を行ったところ、99 検体 (20.2%) の血清対照の赤血球が目安とする 30~60 秒以内[7]に流れなかった。また、別の 10 検体の検査後、2 名で判定したところ、4 検体の成績に相違が生じたがその 4 検体すべてで血清対照の赤血球が流れていなかった。そのため、N の RBCs を使用した HI 試験で血清対照が流れなかった検体について、前処置として、非働化 (19 検体)、自然凝集素の除去 (10 検体) 及びそれらの組み合わせ (16 検体) を施した。非働化は、被験血清を 56℃、30 分間で加熱して行った。自然凝集素の除去は動物薬メーカー等の手法を手順書に即した方法に改変して実施した。具体的には、V 底マイクロプレート上で供血個体 (ここでは N) の 10% RBCs と被検血清を 1 時間反応させ、その上清を HI 試験に用いた。これらの結果、前処置により血清対照の赤血球が流れるようになったのは、非働化の場合に 11 検体 (59.7%) だったのに対し、自然凝集素の除去では 10 検体 (100%)、それらの組み合わせでは 16 検体 (100%) であり、自然凝集素の除去が有効であった。

### 検証 4

赤血球は沈降しやすく、U 底マイクロプレート上で反応させる際に、RBCs の規定濃度 (0.5%) [7] と濃度が異なっている可能性が考えられた。そこで、どの程度の RBCs 濃度の違いが成績に影響するのか検証した。0.125、0.25、0.375、0.5、0.625、0.75、0.875% の RBCs を BB から作成し、5 検体についてそれぞれ HI 試験を実施した。結果、規定濃度と 0.125% 異なるだけで成績に相違を生じた検体が 2 検体、0.25% 異なると成績に相違を生じた検体を 1 検体確認した。

0.125%、0.25% の RBCs 濃度の違いは目視では判別しにくいですが、それでも成績に影響することが示唆された。RBCs のプラスチックからリザーバーへの移動時、リザーバーからマイクロプレートへの分注時に、攪拌、ピペッティングを入念に行う必要がある。

### 検証 3 と検証 4 のまとめ

検証 3 で実施した自然凝集素除去の方法、検証 4 から得られた RBCs 濃度に関する注意点を手順書に加筆した。その他、正確なピペット操作、乾燥による液量変化防止などに関して

記述するとともに、検査員 2 名に聞き取りした手技上の間違いやすい点、分かりにくい点も明確化した。

### エライザの導入

しかし、供血個体を同一とした上で、改変した手順書により、50 検体を検査員 X と著者で検査した結果、23 検体 (46%) に相違を認めた。さらに、別の 50 検体を検査員 Y と著者で検査しても 17 検体 (34%) に相違を認めたため、検証 1~4 以外の要因が考えられた。そこで、判定時の見方 (完全凝集抑制した管がどこまでなのかの見きわめ) を 3 者間で統一し、72、81 検体の判定をそれぞれ検査員 X と著者、検査員 Y と著者とで判定した結果、成績の相違が 8 検体 (11%)、13 検体 (16%) と低減した。各人の判定時の見方の違いは成績を左右する要因と考えられた。

そこで、客観的判定が可能なエライザの導入を検討した。ただし、感染・発症防御の可否は S/P 値では評価できないため、S/P 値から HI 価を推定することが必須となる。

285、111、280 検体をそれぞれ JL、BB、N の RBCs を用いて HI 試験を行うとともに、「ND エリーザキット」(IDEXX 社) を用いてエライザを実施した。その後、鶏種ごとの S/P 値と HI 価 (2 を底とする対数に変換) について相関関係を調査した。結果は以下の散布図 (図 1) に示した。

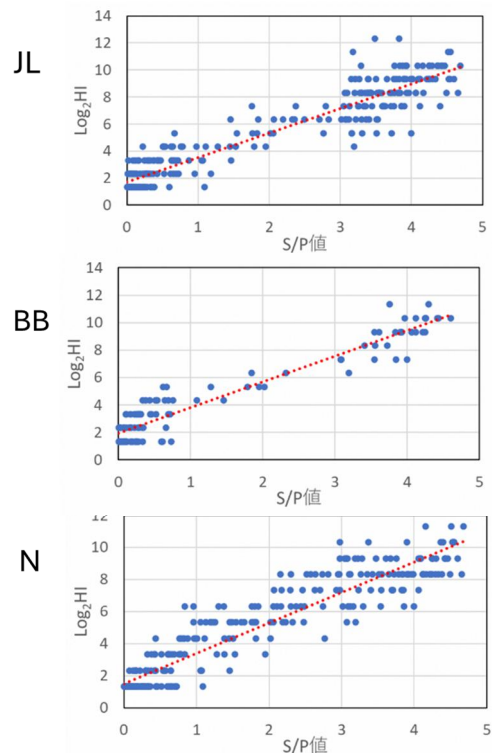


図 1 S/P 値と HI 価の相関関係

全鶏種の S/P 値及び  $\log_2$ (HI 価) は正規分布しないと判断し、Spearman の順位相関係数を算出したところ、全鶏種で強い相関を認めた。S/P 値と  $\log_2$ (HI 価) との関係性を示す単回帰式は表 4 のとおりであり、鶏種間で近似していた。残差正規性を考慮すると、BB の場合により信頼性が高いと思われる。

表 4 S/P 値と 3 鶏種の HI 価の関係

Spearmanの 順位相関係数	単回帰式	残差正規性		
		ヒストグラム	QQプロット	Shapiro-Wilk検定
JL 0.911	$\log_2(\text{HI価})=1.8189 \times (\text{S/P値})+1.6929$	○	△	×
BB 0.873	$\log_2(\text{HI価})=1.8793 \times (\text{S/P値})+1.9177$	○	○	○
N 0.929	$\log_2(\text{HI価})=1.8950 \times (\text{S/P値})+1.5034$	○	○	×

### エライザ導入の考察

先述のとおり、供血個体自体の HI 価が成績に影響する可能性が示唆され、また、感染・発症防御に要する HI 価を導出している文献では供血個体として SPF 鶏もしくはワクチンフリーの ND 抗体を持たない個体を用いている。家保での HI 試験のために、SPF 鶏もしくは ND 抗体を持たない個体を用意することは非現実的だが、少なくとも低 HI 価個体を用いて HI 試験を実施すべきである。また、エライザを利用する場合も、低 HI 価個体から求められた単回帰式で HI 価を推定すべきである。今回、3 鶏種の供血個体で S/P 値と HI 価を求めたが、3 鶏種の供血個体自体の HI 価は未測定であり、低 HI 価個体を用いた場合に単回帰式が大きく変わる可能性もある。したがって、低 HI 価個体を用いた HI 価とその S/P 値のデータの蓄積が必要であると考えられる。

### 現時点でのエライザの利用法

今回、3 鶏種の供血個体自体の HI 価は未測定であったが、その飼養農場の GM は分かっており、JL、BB、N の農場の GM は直近で各々 160.0、13.2、183.8 であった。仮に今回用いた各供血個体が飼養農場の GM と同様の HI 価であったと考えた場合、BB が極端に低値である。そこで、低 HI 価の可能性のある BB の単回帰式の利用を検討し、現時点では大まかな推定として逆推定の手法が利用可能と判断した。

発症防御の目安となる GM10 を 95% の確率で上回る S/P 値の平均値は、図 2 から 1.1001、GM10 を 95% の確率で下回る S/P 値の平均値は 0.3942 と算出される。そのため、各農場 10 羽のエライザを実施し、その S/P 値の平均値が 1.1001 を上回れば、GM が 10 を超える可能性が高く、発症防御が可能、平均値が 0.3942 を下回れば、GM10 未満となる可能性が高く、発

症防御が不可能と判定する。平均値が 0.3942 ~ 1.1001 にあれば、HI 試験を適用すべきである。

GM10を95%の確率で上回るS/P値の平均値は、予測値の95%信頼区間の下限値がHI価10を上回ればよいことから、予測値を $\hat{y}$ 、残差標準偏差を $\sigma$ ( $=0.9272$ )、検体数を $n$ ( $=10$ )、自由度 $10-1=9$ のt分布の97.5%点を $t_{0.05(n-1)}$ ( $=2.2622$ )とすると、

以下を満たす $\hat{y}$ の最小値

$$\hat{y} - t_{0.05(n-1)} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} > \log_2(10)$$

GM10を95%の確率で下回るS/P値の平均値は、予測値の95%信頼区間の上限値がHI価10を下回ればよいことから、

同様に、

以下を満たす $\hat{y}$ の最大値

$$\hat{y} + t_{0.05(n-1)} \frac{\sigma}{\sqrt{n}} < \log_2(10)$$

図 2 逆推定の手法

### 今後の方向性

供血個体自体の HI 価が成績に与える影響を精査したうえで、改変した手順書に基づき、確実に低 HI 価である供血個体から得られる HI 価とその S/P 値のデータを蓄積すべきである。それらのデータから単回帰式を再構築し、将来的には ELISA 単独で各検体の HI 価を推定可能と考える。

### 謝辞

逆推定についてご助言をいただいた、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、動物衛生研究部門疫学・昆虫媒介感染症グループ(疫学研究室)の松山亮太先生に深謝いたします。

### 参考文献

- [1] 椿原彦吉：鶏病研究会報，5(1)，22-26(1969)
- [2] 村野多可子，本庄章，内野健志，伊能林平：千葉県畜産センター研究報告，8，35-40(1984)
- [3] van Boven M, Bouma A, Fabri T HF, Katsma E, Hartog L, Koch G: Avian Pathol, 37(1), 1-5(2008)
- [4] Sultan S, Hamed M, Osman N: Thai J Vet Med, 51(1), 141-150(2021)
- [5] Mahamud S NA, Bello M B, Ideris A, Omar A R: J Vet Sci, 23(4), 1-14(2022)
- [6] WOA: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals, chapter 3.3.10., パリ(2021)
- [7] 明治アニマルヘルス株式会社：「ニューカッスル病ウイルス赤血球凝集素」使用説明書