ネフェロメトリーによる牛血清および乳汁中 IgG の測定

大山和幸¹⁾ 元井霞子²⁾ 大橋 傳²⁾

宮崎 茂²⁾ 山本英雄³⁾

1) 北海道渡島家畜保健衛生所 (函館市西桔梗町 555-13 〒041)

2) 農林水産省家畜衛生試験場 (つくば市観音台 3-1-1 〒305)

3) 株式会社森乳ラボラトリーズ (東京都港区芝 5-34-6 〒108)

(平成 4 年 1 月 10 日受付・平成 4 年 6 月 26 日受理)

Measurement of Immunoglobulin G in Bovine Serum and Milk by Nephelometry
KAZUYUKI OYAMA*, YOSHIKO MOTOI, TSUTAE OHASHI, SHIGERU MIYAZAKI, HIDEO YAMAMOTO
Oshima Livestock Hygiene Service Center, Hokkaido Prefecture, Hakodate-shi, Hokkaido 041

牛の血清および初乳中の免疫グロブリンの 85% 以上は IgG であるとされている³⁾。特に、初乳中の IgG は子牛の免疫獲得に寄与している。また、IgG はオプソニン効果により非特異的な生体防衛に重要な役割を果たしており、その測定は免疫機能を知るうえで重要な臨床検査項目の 1 つとなっている。現在、IgG の測定には 1 元放射免疫拡散法 (SRID 法) が広く用いられているが、判定結果を得るのに長時間を要することから多数の検体を同時に処理することには限界がある。

そこで、これらを解消するため溶液内沈降反応に応用したネフェロメトリーにより、牛血清および乳汁中の IgG を測定し従来の SRID 法と比較検討した。

材料および方法

ネフェロメトリーによる測定法

測定法として用いたネフェロメトリーの原理は溶液内沈降反応により生ずる抗原抗体沈降物の光散乱を光学的に定量することにある^{12,16)}。すなわち、抗原抗体沈降物 (細粒子) に一定波長の光を照射すると、光は吸収、屈折、散乱をおこす。この時生じた散乱光を集光し、光の散乱強度をとらえると、この強度と抗原抗体反応で生成された沈降物との間には Rayleigh の法則が成立し^{12,16)}、抗体と反応した抗原濃度に比例して光強度が変化する。したがって、試料に光を照射し、散乱光の強度を測定することにより抗原濃度を求めることができる。

今回の方法では光源にハロゲンランプを用い、波長 490nm の干渉フィルターを通して試料に照射し、直角方向の散乱光を測定した (図 1)。

試薬および操作法

試薬の調整: 牛 IgG は市販品 (ヤガイ社製) を用い標準液の調整を行った。また、抗血清は家兔を用いて作成した¹⁾。抗血清調整液は pH 7.4 のリン酸緩衝生理

食塩液に、ポリエチレングリコール (PEG) 6000 を 4% に溶解し 0.45 μ m フィルターで濾過して用いた。抗血清を抗血清調整液で 25~35 倍に希釈して抗体試液とした。

検体の調整: 生理食塩液を用いて血清は 101 倍 (検体 10 μ l に希釈液 1ml) に希釈し、乳汁は 3000 回転 15 分遠心して脱脂後 401 倍に希釈した (検体 10 μ l に希釈液 4ml)。また、標準液も同様に 101 倍に希釈して使用した。

操作方法: 希釈検体、対照 (生理食塩液) および各標準液 (IgG 濃度 5, 10, 20, 30, 40, 60, 80 mg/ml) それぞれ 10 μ l をマイクロプレートにいれ、抗体試液 180 μ l を加え 6 分間常温 (20 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C) で反応後、直角測光方式の蛍光分析用マイクロプレートリーダー (日産合成工業社製) で励起波長 490nm で測定し、標準曲線より IgG 濃度を求めた。

供試材料

臨床的に健康な黒毛和種 (21 日から 194 日齢) 326 頭およびホルスタイン種 (生後 1 日から 80 日齢) 126 頭の血清を採取して測定した。また、黒毛和種 2 頭、ホルスタイン種 6 頭から分娩直後から 10 日後まで経時的に初乳を採取して測定に用いた。

図 1 ネフェロメトリーの原理

SRID 法との比較

本法と従来から用いられている SRID 法とを比較するため、血清 14 例および乳汁 21 例における IgG 濃度をイムノプレート低レベルタイプ (The Binding Site Ltd.) を用いた SRID 法によって IgG 濃度を測定した。SRID 法ではサンプル 5 μ l を用い 48 時間反応後測定した。

成 績

標準曲線

ネフェロメトリーによる IgG の標準曲線は 5~60 mg/ml の広範囲な濃度で直線性が得られた (図 2)。

SRID 法との相関

14 例の血清と 21 例の乳汁における値についてネフェロメトリーと SRID 法とを比較検討した結果、その相関係数は血清で 0.997 (図 3)、乳汁で 0.994 とともに高い値を示した。しかし、一部の乳汁ではネフェロメトリーによる測定値の方が SRID 法による値よりやや低値を示した (図 4)。

再現精度

2 つの濃度の標準 IgG (7.5, 20mg/ml) と活性値の

図 2 ネフェロメトリーによる IgG の標準曲線

図 3 ネフェロメトリーと SRID 法の相関 (血清)

異なる血清 2 例をそれぞれ 8 回ずつ同時に測定して一時再現精度を検討したところ、変動係数は 3.5% から 6.5% の間で平均 4.6% と低く各例とも高い再現性が得られた (表 1)。

抗原抗体反応に及ぼす影響

共存物質の影響：標準 IgG 10mg/ml にヘモグロビン (和光純薬製) 200, 300, 400, 500mg/dl, ビリルビン (シグマ社製) 5, 10, 20mg/dl をそれぞれ加え 100 倍に希釈して測定したが、その影響は認められなかった。

反応温度および時間：15, 25, 30℃で反応時間を 1.5,

図 4 ネフェロメトリーと SRID 法の相関 (乳汁)

表 1 ネフェロメトリーによる再現精度

検 体	1	2	3	4
最大値 (mg/ml)	21.2	8.5	9.0	37.0
最小値 (mg/ml)	19.0	7.0	8.0	32.5
変動幅 (mg/ml)	2.2	1.5	1.0	4.5
平均値 (mg/ml)	19.9	7.7	8.5	33.6
標準偏差 (mg/ml)	0.9	0.5	0.3	1.4
変動係数 (%)	4.3	6.5	3.5	4.1

表 2 血清中の IgG 濃度 (黒毛和種)

日 齢	頭 数	IgG 濃度 (mg/ml)
21~45	50	7.55 $\pm$ 2.32
46~75	55	7.55 $\pm$ 2.04
76~105	61	8.74 $\pm$ 1.83
106~135	64	9.54 $\pm$ 2.22
136~165	60	10.90 $\pm$ 2.48
166~194	36	10.92 $\pm$ 2.39
計	326	9.17 $\pm$ 2.58

表 3 血清中の IgG 濃度 (ホルスタイン種)

日 齢	頭 数	IgG 濃度 (mg/ml)
1~7	46	20.99 $\pm$ 7.57
8~14	22	19.76 $\pm$ 7.93
15~21	24	15.95 $\pm$ 7.33
22~49	19	12.09 $\pm$ 4.90
50~80	15	8.59 $\pm$ 2.97
計	126	17.00 $\pm$ 8.07

表4 乳 汁 中 IgG の 変 動

検体番号	乳 汁 中 IgG 濃 度 (mg/ml)							
	分娩直後	12時間	24時間	2 日	4 日	6 日	8 日	10日
No. 1 (黒毛)	89.6	51.3	26.1	13.8	6.3	2.1	1.5	0.9
No. 2 (黒毛)	139.9	92.4	67.0	37.4	17.0	2.1	1.5	0.9
No. 3 (ホル)	78.8	51.0	24.0	1.2	0.8	0.6	0.6	0.6
No. 4 (ホル)	26.0	18.8	11.7	7.6	0.8	0.6	0.6	0.6
No. 5 (ホル)	69.6	38.5	16.8	8.6	1.2	0.8	0.6	0.6
No. 6 (ホル)	26.0	20.0	7.5	4.0	1.2	0.6	0.6	0.6
No. 7 (ホル)	57.0	39.0	10.5	7.5	1.2	0.6	0.6	0.6
No. 8 (ホル)	39.0	32.5	21.0	6.5	1.2	0.6	0.6	0.6

3, 5, 7, 8.5, 10 分と変えてそれぞれ測定したが, 差は認められなかった。

プロゾーン現象: 抗原抗体反応では避けられない問題となるプロゾーン現象 (抗原過剰) は, 60mg/ml まで認められず通常の血清および乳汁では測定に支障をきたさなかった。

血清中の IgG 濃度

血清中の IgG 濃度は黒毛和種子牛では平均 9.17 ± 2.58 mg/ml で加齢とともに増加する傾向を示した。ホルスタイン種子牛では血清 IgG 濃度は平均 17.00 ± 8.07 mg/ml で, 生後 7 日までが 20.99 ± 7.57 mg/ml と最も高く次第に減少する傾向を示した (表 2, 3)。

乳汁中の IgG 濃度の推移

乳汁中の IgG 濃度は, 黒毛和種, ホルスタイン種ともに分娩直後が高く, 黒毛和種で平均 114.75 ± 35.60 mg/ml ホルスタイン種で 49.40 ± 22.51 mg/ml であった。また, 乳汁中 IgG 濃度は分娩 24 時間以後急速に減少し, 分娩直後の濃度の半量以下になり, その後さらに減少しおよそ 6 日目以降にはほぼ一定の低い値になった (表 4)。

考 察

IgG 濃度の測定は免疫機能を知るうえに重要な検査項目である。野外では子牛の下痢や肺炎等が問題になっているが, これら疾病の発生と IgG との間には密接な関係があることが報告^{2, 4, 5, 7, 9, 11)}されている。特に, 牛では母子免疫は初乳を介して行われており, なんらかの原因で初乳を適正に与えられなかった子牛では低ガンマグロブリン血症を呈し, 各種感染症に対し感受性が高くなる⁷⁾。このことから, 血清だけでなく乳汁中 IgG を測定することは重要と思われる。人においては IgG の測定はすでに SRID 法から免疫化学的自動分析法へと進められ, 現在ではネフェロメトリー, 免疫比濁法 (TIA 法) などが主に用いられている。しかしながら, 牛の IgG 測定法は SRID 法のみであることから, その野外での応用が制限されている。

SRID 法^{10, 16)}は簡単な操作でできる反面, 反応時間が

長いうえに測定濃度範囲が限られているなどの難点がある。いっぽう, ネフェロメトリーは 1967 年に RITCHIE¹⁵⁾によって初めて行われ, その後 1970 年代に確立され, 医学分野では日常分析法として一般化されている^{12, 16)}。今回行ったネフェロメトリーは直角測光式の蛍光ネフェロメトリーで, マイクロプレートを使用することが特徴である。この方法では, ネフェロメトリーは散乱光の強度を測定するため, 共存物質の影響が問題となる。初乳では特に蛋白質, 脂肪等を多く含んでいることから脱脂等の操作が必要であり, やや煩雑さは残る。しかし, ネフェロメトリーでは測定の時間が大幅に短縮することができ, 一度に大量の検体を同時に処理することが可能である。ネフェロメトリーによる IgG 濃度は, 血清, 乳汁ともに SRID 法で得られた値と極めて高い相関を示し再現精度も高かった。

牛の血清中の IgG 濃度に関する報告^{4, 8, 13)}は比較的少なく, 特に黒毛和種の報告はほとんどみられない。新生子の初乳からの IgG の獲得は血清の IgG 濃度に反映すると思われる, その獲得の程度を早急に察知することが疾病防除の点からも重要と考えられる。今回測定した黒毛和種子牛血清中の IgG は生後 21 日齢からであり, 初乳接種と血清濃度との関係を把握することはできなかった。さらに, ホルスタイン種についても初乳接種の有無については把握されていないので, 同様に初乳および血清濃度との関連性については明確にできなかった。したがって, 今後さらに検討を加え, これらの関係について明確にする必要があると思われる。しかし, 乳汁では従来の報告^{6, 14)}のとおり 24 時間以内に IgG 量は急激に減少することが認められ, 免疫獲得のために早期に初乳を与えるなければならないということが明らかとなった。

以上のように, ネフェロメトリーによる IgG の測定は簡易性, 迅速性等の点から, 今後野外での応用が十分期待できる方法と思われる。

引 用 文 献

- 1) 阿部恒夫: Jpn J Zootech Sci, 43, 493 (1972)
- 2) A D MCEWAN, E W FISHER, I E SELMAN: J

- Comp Pathol, 80, 259~265 (1970)
- 3) BUTLER J E: J Am Vet Med Assoc, 163, 795 (1973)
 - 4) DALE D HANCOCK: J Dairy Sci, 68, 163~183 (1985)
 - 5) 江藤 茂, 西田一義, 大野淑博ほか: 日獣会誌, 35, 708~712 (1982)
 - 6) HOERLEIN A B, JONES D L: J Am Vet Med Assoc, 170, 325 (1977)
 - 7) 石川 潤: 家畜診療, 326, 5~12 (1990)
 - 8) JEANNE L BURTON, B W KENNEDY, E B BURNSIDE, et al.: J Dairy Sci, 72, 135~149 (1988)
 - 9) K NORHEIM, E SIMESSEN, K E GJESTANG: Nord Vet Med, 37, 113~120 (1985)
 - 10) 右田俊介: 臨床検査, 20, 3, 23~35 (1976)
 - 11) M R WILLIAMS: Vet Rec, 96, 81~84 (1975)
 - 12) 大竹皓子: 検査と技術, 16, 7, 599~605 (1988)
 - 13) 岡野 彰, 居在家義昭, 島田和宏ほか: 中国農研報, 2, 13~20 (1988)
 - 14) PORTER P: Biochim Biophys Acta, 236, 664~674 (1971)
 - 15) RITCHIE R F: J Lab Clin Med, 70, 5 (1967)
 - 16) 山岸安子: 検査と技術, 16, 7, 634~637 (1988)

日生研の動物用ワクチン

M2-11

- 日生研ニューカッスル生ワクチン
- 日生研NB生ワクチン
- 日生研IB生ワクチン
- 日生研C-78・IB生ワクチン
- 日生研ILT生ワクチン
- 日生研マレックワクチン
- 日生研IBD生ワクチン
- AE乾燥生ワクチン
- 日生研穿刺用鶏痘ワクチン
- 日生研乾燥鶏痘ワクチン
- ネオ日生研ニューカッスル不活化ワクチン
- 日生研NB不活化ワクチン
- 日生研ニューカッスル・コリーザ混合ワクチン
- 日生研IBD不活化ワクチン
- 日生研コリーザワクチン
- 日生研C型菌コリーザワクチン
- 日生研コリーザ2価ワクチン
- 日生研MG不活化ワクチン

- 日生研日本脳炎生ワクチン
- 日生研豚TGE生ワクチン
- 豚コレラ生ワクチン
- 日生研豚丹毒生ワクチンC
- 日生研日本脳炎TC不活化ワクチン
- 日生研豚TGE濃縮不活化ワクチン
- 日生研豚ARワクチン
- 日生研豚PLE不活化ワクチン

- イバキ病生ワクチン“日生研”
- 日生研牛アデノ生ワクチン
- IBR生ワクチン“日生研”
- IBR・BVD・PI 混合生ワクチン“日生研”
- アカパネ病生ワクチン“日生研”
- 日生研チュウザン病不活化ワクチン
- 牛流行熱不活化ワクチン

- 日生研日本脳炎TC不活化ワクチン
- 日生研馬インフルエンザワクチン
- 日生研馬ゲタウィルス感染症不活化ワクチン
- 馬鼻肺炎不活化ワクチン“日生研”

- 日生研狂犬病TCワクチン

日生研ジステンパーワクチン「ミンク用」
日生研緑膿菌感染症不活化ワクチン

■ 印は要指示医薬品です。

日生研株式会社

〒198 東京都青梅市新町2221-1

TEL: 0428-33-1004~9 (営業部)
0428-33-1056 (學術部)

9208