

## ウマ新生子黄疸症予防検査への 抗ウマ $\gamma$ グロブリンモノクローナル抗体の応用

赤島 智博・白尾 淳之・寺田 有<sup>1</sup>・大和 康夫<sup>1</sup>・天野 卓<sup>2</sup>・横濱 道成

東京農業大学生物産業学部, 北海道網走市字八坂 196 099-2422

<sup>1</sup>日高軽種馬農業協同組合, 北海道静内郡静内町神森 175 056-0002

<sup>2</sup>東京農業大学農学部家畜育種学研究室, 神奈川県厚木市船子 1737 243-0034

### Clinical application of anti-horse $\gamma$ -globulin monoclonal antibodies for preventing equine neonatal isoerythrolysis

Tomohiro AKASHIMA, Junji SIRAO, Tamotsu TERADA<sup>1</sup>,  
Yasuo OHWA<sup>1</sup>, Takashi AMANO<sup>2</sup> and Michinari YOKOHAMA

Laboratory of Animal Resources, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture,  
196 Aza-Yasaka, Abashiri-shi, Hokkaido 099-2422

<sup>1</sup>Hidaka Horse Breeder's Association Shizunai Equine Hospital,  
175 Kaminomori, Shizunai-tyou, Shizunai-gun, Hokkaido 056-0002

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Genetics and Breeding, Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture,  
1737 Hunako, Atugi-shi, Kanagawa 243-0034

キーワード: ウマ, 新生子黄疸症, モノクローナル抗体, クームス試験

Key words: Horse, Neonatal isoerythrolysis, Monoclonal antibody, Coombs test

#### 要 約

血液型不適合による子馬の黄疸症(新生子黄疸症)の予防検査は, 抗ウマ $\gamma$ グロブリンポリクローナル抗体(pAb)を検査試薬とした赤血球の間接凝集試験(クームス試験)によって実施されている。本疾患の発症の予防は, 子馬赤血球抗原に対する母馬血清中のクームス抗体の力価レベルに従い, 分娩後の新生子馬の初乳摂取開始時期を遅らせる方法で行われている。しかし現在使用されているpAbは発症の原因となるクームス抗体以外とも反応するため, 本来発症しない子馬の母馬をも陽性馬と判定し, 子馬への不必要な断乳が行われ, 多くの免疫移行不全馬が作出されている。そこで新たに開発した抗ウマ $\gamma$ グロブリンモノクローナル抗体(mAb: YOKOHAMAら1998)検査試薬を用いて臨床検査を行った結果, mAbはpAbよりもクームス抗体への特異性が高く, mAb検査陽性率はpAb検査陽性率の約4割にまで低下させた。またmAbではpAbよりも, 発症馬のクームス抗体の力価が高い値(640-2,560倍)となった。しかしクームス抗体の力価の変動は, 分娩の60日以前には認められず分娩日間近に上昇する傾向がうかがえることから, 検査の時期は, 正確な分娩日を把握して採血を分娩日に

近い日に行うことが望ましいと思われた。mAbによって検出した母馬血清中のクームス抗体の力価を基準とした断乳時間を新たに定めることにより, 本疾患の発症を効果的に予防できるものと思われた。

#### 緒 言

ウマの同種免疫性溶血性貧血(以下黄疸症)は母子間の血液型不適合が原因となって発症する。新生子馬の受動免疫は, 初乳中に含まれる免疫グロブリンを摂取することで得られているが, 黄疸症の発症は母馬体内で産生された子馬赤血球を感作する抗体(血液型不適合抗体: クームス抗体)を摂取することにより喚起される(BECHT & SEMRAD, 1985)。発症の要因であるクームス抗体は, 母馬の体内に存在する赤血球感作抗体の中でも特に赤血球の凝集を引き起こさない一価抗体であることから(細田ら, 1959 A, B), 予防検査は妊馬血清中の抗体力価をクームス試験によって測定して行われている。

現在, 予防検査はpAbを検査試薬として実施され, 予防処置は検査結果の抗体力価に従い子馬への初乳の授乳を制限して行われているが, 発症率が0.1から0.2%であるのに対して検査陽性率は10から20%である。そのため子馬への不必要な断乳を行わなければならない, 初乳を飲まないことにより, 正常な移行抗体が得られず, 免疫移行不全馬が作出されている。

本研究では YOKOHAMA ら (1998) が開発した mAb 検査試薬について臨床検査を行い、その実用性を検討した。mAb の有効性について、黄痘発症の原因抗体を特異的にとらえて検査陽性率を下げることができ、pAb よりもクームス抗体を検出する優れた検査試薬であるか否かを検討した。また mAb 検査の結果を踏まえて断乳処置を行ったあとに子馬へのクームス抗体の感作状態をも調べ、授乳を制限した時間が適切なものであったかについて調査した。

## 材料および方法

### (1)pAb および mAb の作製

pAb はウマ γ グロブリン成分を家兎に注射して産生させ作製した。

mAb はウマ γ グロブリン成分を CF # 1 系雌マウスに注射し、ポリエチレングリコールを使用した細胞融合法により作製した (YOKOHAMA, 1998)。また検査試薬 (TS 10+4) として、クームス試験により黄痘発症馬母馬血清に極めて強く反応し、かつ黄痘非発症馬母馬血清に対して反応を示さなかった TS-10 および TS-4 の 2 種類の mAb は、1:1 の割合で混合して用いた。

### (2) 予防検査対象馬頭数

平成 8 年度および平成 9 年度に黄痘症予防検査を行った北海道日高地区の競走用軽種馬の繁殖雌馬について、それぞれ 3,660 頭および 3,401 頭を検査対象にした。

### (3) 解離試験による子馬赤血球感作抗体の調査

断乳処置後の子馬への移行抗体力価を調べるための血液サンプルは、日高軽種馬農協において任意に選抜された予防検査対象母馬の新生子馬、計 36 頭から採取した。血球は採取後に遠心分離し、生理的食塩水で 3 回洗浄した。続いてエーテル解離法により赤血球感作抗体を含む解離抗体液を回収し、解離抗体の力価をクームス試験によって測定した。

## 結果および考察

### (1)mAb を用いた黄痘症予防検査の実用性

表 1 に平成 8 および 9 年度の pAb および mAb を

用いた臨床検査の結果を示した。pAb 検査の陽性率はそれぞれ 15.16% (555 頭) および 9.80% (333 頭)、mAb 検査の陽性率はそれぞれ 3.61% (132 頭) および 4.59% (156 頭) で、mAb 検査陽性率は pAb 検査陽性率の約 4 割にすぎなかった。

両年度とも pAb 検査の抗体力価を基準として断乳時間が指示されているが、実際は mAb 検査の結果を参考に溶血試験、過去の発症歴および臨床データを考慮して診断されていた。この mAb 検査結果は断乳時間に反映され、平成 8 年度よりも 9 年度の方が 3 時間や 6 時間のように短い時間で授乳制限を指示されたウマが増加し、18 時間や 24 時間のように長い時間で指示されたウマが減少する結果となっていた (表 2)。

mAb の抗体力価に基づく断乳方法は pAb よりも断乳時間を短縮することができ、免疫移行不全馬の発生を減少させることができるものと考えられた。

また予防処置後、黄痘発症率は 8 年度が 0.16% (6 頭)、9 年度が 0.09% (3 頭) であった。原因は mAb 検査試薬の特異性による検査上の問題ではなく、指示した断乳時間よりも早い時間に子馬に授乳させたか、もしくは検査後から分娩までの間に母馬体内のクームス抗体の力価が上昇したためであった。

pAb を用いた臨床検査の結果に加え、mAb 検査の結果を考慮した平成 8 および 9 年度の最終的な検査陽性率は、それぞれ 9.62% (352 頭) および 9.70% (330 頭) であり、この方法によっても検査陽性率の改善ができるものと考えられた。

### (2) 解離試験の結果と断乳時間

解離試験の検体である新生子馬の多くは、予防検査後に指示された断乳時間よりも早く初乳を摂取していた (表 3)。

表 2 mAb 検査後の断乳時間およびその対象馬頭数

検査年度 断乳時間	平成 8 年度 (検体頭数)	平成 9 年度 (検体頭数)
3	52	93
6	62	84
12	67	57
18	72	44
24	99	52

表 1 黄痘症予防検査結果および発症率

検査年度 (検体数)	平成 8 年度 (3,660)	平成 9 年度 (3,401)
pAb クームス試験陽性率 (陽性検体数)	15.16% (555)	9.80% (333)
mAb クームス試験陽性率 (陽性検体数)	3.61% (132)	4.59% (156)
検査最終結果陽性率 (陽性検体数)	9.62% (352)	9.70% (330)
発症率 (発症馬頭数)	0.16% (6)	0.09% (3)

陽性率 (%) : 陽性検体数 / 全検査頭数 × 100  
 発症率 (%) : 発症馬頭数 / 全検査頭数 × 100

表3 間接クームス試験および解離試験結果

検体 番号	クームス試験抗体力価		解離試験抗体力価			断乳 時間	備 考
	pAb	mAb	pAb	mAb	採 血		
1	0	0	0	0	分娩2日後	無	乳汁クームス試験のみ陽性
2	64	0	0	0	分娩2日後	24	過去発症馬 (H. 2)
3	32	20	1~2	1~2	初乳摂取後24時間後	18	生後4時間後に母乳摂取
4	16	2.5	0	0	初乳摂取後24時間後	6	生後2時間後に母乳摂取
5	32	0	0	0	分娩翌日	1	1時間断乳
6	0 (64)	0 (1280)	8	8~16	発症時	無	生後12日に発症
7	32	2	0	0	分娩2日後	24	生後12時間後に母乳摂取
8	64	5	0	0	分娩2日後	24	生後18時間後に母乳摂取
9	16	5	0	0	分娩翌日	18	生後14時間後に母乳摂取
10	32	10	0	0	分娩2日後	18	生後18時間後に母乳摂取
11	64	5	0	2	分娩翌日	6	生後18時間後に母乳摂取
12	16	5	0	0	分娩翌日	12	生後6時間後に母乳摂取
13	64 (64)	160 (1280)	1	1	分娩翌日	24	生後7時間後に母乳摂取
14	16	20	0	0	分娩翌日	12	生後4時間後に母乳摂取
15	64 (64)	160 (2650)	64~128	16	発症時	24	生後12時間後に母乳摂取
16	64	80	0	0	分娩2日後	24	生後24時間後に母乳摂取
17	16	5	±	±	分娩2日後	12	断乳せず初乳摂取
18	8	10	0	0	分娩翌日	6	生後6時間後に母乳摂取
19	16	0	0	0	分娩当日	無	再検査でmAb力価5倍
20	16	5	0	0	初乳摂取後24時間後	12	断乳せず初乳を摂取
21	8	0	2	2	分娩翌日	6	クームス試験陰性, 解離試験陽性
22	8	0	0	0	分娩当日	6	pAbクームス試験のみ陽性
23	64	10	0	0	分娩翌日	24	生後4時間後に母乳摂取
24	32	5	0	0	分娩翌日	18	生後1時間30分後に母乳摂取
25	64	40	0	0	分娩2日後	24	生後14時間後に母乳摂取
26	0	0	0	0	分娩翌日	無	陰性
27	8	0	0	±	分娩翌日	無	乳汁クームス試験において陽性
28	0	0	0	0	分娩翌日	無	陰性
29	0	0	0	0	分娩当日	無	乳汁クームスpAbの検査のみ陽性
30	32	20	0	0	初乳摂取後24時間後	18	生後3時間後に母乳摂取
31	64	40	0	0	分娩翌日	18	生後18時間後に母乳摂取
32	0	0	0	0	分娩翌日	無	陰性
33	16	0	0	0	分娩翌日	無	断乳せず, 初乳を摂取
34	32	0	±	±	分娩翌日	無	断乳せず, 初乳を摂取
35	16	10	0	±	分娩当日	6	生後3時間後に母乳摂取
36	NT (64)	NT (640)	32	8	初乳摂取後24時間後	無	予防検査せず, 再検査のみ実施

■ : 発症馬

※抗体力価はサンプルの希釈倍数で示し, 「NT」は未検査「±」は疑陽性を表す

※検体から得たサンプルが複数の場合は, その検体の抗体力価の最大値を表記した

※検体「13」の解離試験の結果は, 黄疸症の治療として輸血後のサンプルを用いたものである

※発症馬のみ再検査 (分娩日採血サンプル)の抗体力価を ( ) 内に記した

36例の解離試験の結果, 発症馬<表3のNo.6, 13, 15, 36>を含めた11検体はmAbおよびpAbを用いた検査の一方または双方において疑陽性から128倍までの力価を示したが, 残りの3分の2を占める25検体はmAbおよびpAb検査で共に陰性で移行抗体は認められなかった。これはpAb検査後に指示した断乳時間が必要以上に長いことを示す証拠で, その結果, 正常な免疫抗体の移行を妨げていることを示していた。

また予防検査においてpAb検査で陽性, mAb検査

で陰性であった検体は計8検体存在し, 断乳時間はそれぞれ異なったが発症に至らなかった。これらの検体は解離試験において, 高く2倍の力価にとどまり, mAb検査の結果から授乳を制限する必要がない例と考えられた。

以上のことからpAb検査で陽性と診断され, 断乳処置を受けていた新生子馬の中には断乳する必要のないもの, もしくは断乳時間をより短縮できるものが含まれていると考えられた。またmAbで陰性, pAbで陽性

を示した母馬のクームス抗体は多少摂取しても発症に至らないと思われた。従って、mAb 検査試薬を用いた予防検査システムを確立するため、これまで pAb 検査の抗体力価を基準に定めていた断乳時間をそのまま mAb 検査に適用するのではなく、mAb 検査結果の抗体力価に対して新たに基準を定める必要があると考えられた。

### (3)クームス抗体と黄痘の発症

平成9年度の発症例は、予防検査（スクリーニング検査）を受けずに発症した1例を加えて4例であった（表3）。これらの検体はいずれも再検査の結果、pAb では64倍の力価であったがmAbでは640倍から1,280倍と極めて高い力価を示した。これはmAbがpAbよりも発症の原因となるクームス抗体と的確に反応していることを示しているものと考えられた。また解離試験の結果はpAbの試験で8~128倍、mAbの試験で8~16倍であった。陽性検体中の赤血球感作抗体の中には黄痘症に関与しない非発症性の抗体が存

在し、pAbはその非発症性のクームス抗体をとらえているため、これが過剰に陽性検体率を上げる要因であると思われた。

発症は単に抗体量の違いなのか、また発症に直接関与する抗体のサブクラスが存在するのかは明らかではないが、mAbは発症性のクームス抗体に極めて特異的に反応しているものと考えられた。

### (4)採血日から分娩日までのクームス抗体力価の変動

日高地区における予防検査は、日高軽種馬農協の指導のもとで実施されている。検査頭数は非常に多く、検査を行うために多大な労力、時間などが要求される。実際、平成9年度には予防検査のための採血日から検査日まで早くて3日、遅ければ34日間、平均約20日間かかり、また採血日から分娩日まで早くて46日、遅ければ143日間、平均約76日間（約2カ月間）であった（表4）。

平成9年度に行われたスクリーニング検査と再検査（分娩日または黄痘発症時に母馬から得た血清サンプル

表4 予防検査（スクリーニング検査）および再検査結果

検査番号	採血日 月.日	検査日 月.日	スクリーニング検査		採血日から分娩日 までの日数	分娩日 月.日	再検査（分娩日）	
			pAb力価	mAb力価			pAb力価	mAb力価
2	2.2	3.11	64	0	66	4.10	64	40
3	2.4	2.8	32	20	51	3.28	32	20
4	2.5	2.13	16	2.5	51	3.29	16	5
5	2.4	2.21	32	0	67	4.13	32	5
6	2.4	2.22	0	0	97	5.13	64※	1280※
8	2.4	2.22	64	5	61	4.7	32	5
9	2.5	2.24	16	5	85	5.2	64	5
10	2.4	2.24	32	10	73	4.19	32	5
11	2.5	2.24	64	5	95	5.12	64	0
12	2.4	2.24	16	5	104	5.20	32	5
13	2.3	2.24	64	160	76	4.21	64	1280
14	2.4	2.25	16	20	64	4.10	32	20
15	2.4	2.25	64	160	52	3.29	64	2560
17	2.5	2.25	16	5	84	5.1	32	2.5
18	2.4	2.26	8	10	107	5.23	0	0
19	2.5	2.27	16	0	101	5.18	32	0
20	2.5	2.25	16	5	46	3.24	64	5
21	2.5	2.15	8	0	57	4.4	8	0
22	2.5	2.15	8	0	57	4.4	4	0
23	2.5	2.15	64	10	58	4.5	64	5
24	2.5	2.27	32	5	102	5.19	64	2.5
28	2.5	2.28	8	0	68	4.15	64	2.5
30	1.30	2.15	32	20	54	3.26	32	5
31	1.30	3.4	64	40	71	4.12	64	40
33	1.30	3.6	16	0	108	5.19	32	0
34	1.30	3.6	32	0	104	5.15	64	10
35	1.30	3.6	16	10	116	5.27	16	10

■：発症馬

※検査番号「6」についてのみ再検査は分娩日のサンプルではなく、子馬の生後12日目の発症時のサンプルを用いた結果である

表 5-1 mAb 試験においてスクリーニング検査陰性から再検査陽性へと転じた検体

検体 No.	採血日 月. 日	スクリーニング検査		採血日から検査日 までの期間 (日数)	検査日 月. 日	採血日から分娩日 までの期間 (日数)	分娩日 月. 日	再検査 (分娩日)	
		pAb力価	mAb力価					pAb力価	mAb力価
2	2. 2	64	0	8	3.11	66	4.10	64	40
5	2. 4	32	0	16	2.21	67	4.13	32	5
6	2. 4	0	0	17	2.22	97	5.13	64	1280
28	2. 5	8	0	22	2.28	68	4.15	64	2.5
35	1.30	32	0	34	3. 6	104	5.15	64	10

表 5-2 mAb 試験においてスクリーニング検査陽性から再検査陰性へと転じた検体

検体 No.	採血日 月. 日	スクリーニング検査		採血日から検査日 までの期間 (日数)	検査日 月. 日	採血日から分娩日 までの期間 (日数)	分娩日 月. 日	再検査 (分娩日)	
		pAb力価	mAb力価					pAb力価	mAb力価
11	2. 5	64	5	18	2.24	95	5.12	64	0
18	2. 4	8	10	21	2.26	107	5.23	0	0

ルを用いた試験)のクームス試験の結果から、分娩前後のクームス抗体の力価の変化と採血日と分娩日の間の期間の影響を調べた。

pAb 検査または mAb 検査のどちらかにおいて、抗体力価に変化がみられた検体は 27 例中 23 例、うち mAb 検査においてのみ抗体力価に変化があった検体は 15 例であった(表 4)。また mAb 試験においてスクリーニング検査で陰性、再検査で陽性へと転じた検体は 5 例みられ、逆に陽性から陰性へと転じた検体が 2 例みられた(表 5)。

スクリーニング検査および再検査の mAb 検査の結果から、スクリーニング検査用サンプルの採血日から再検査用サンプルを採血した分娩日までの日数が 60 日以内であれば、ほとんど抗体力価に変化がみられなかった。また 61 日以上であれば 7 割の検体に変化がみられた。しかし、No.15(表 3 と 4)の発症馬は、採血日から分娩日まで 52 日しか経過していないが、力価が mAb を用いた試験で 160 倍から 2,560 倍にまで上昇していた。つまりクームス抗体は分娩日間近に力価が高くなり、その力価の上昇は pAb よりも mAb において、より明確に表れていた。

長期間かかる検査システムは、母馬生体内のクームス抗体量の増減を正確にとらえきれないことが示され、黄疸症に関係するクームス抗体の力価は、分娩日間近に上昇するものと思われることから、クームス試

験による検査精度を上げるには、できるだけ正確な分娩日を把握し、採血を分娩日に近い日に行う必要性が明らかとなった。このように mAb 検査試薬は pAb よりも明らかに発症に関与しているクームス抗体の検出感度が高く、検査陽性率を下げる事が可能であった。より迅速な検査システムが確立できれば、mAb 検査試薬を使用したクームス試験による予防検査は、非常に有効な方法になると考えられた。

## 文 献

- BECHT J. L. and SEMRAD S. D. (1985): Hematology, Blood typing, and Immunology of the Neonatal Foal, Veterinary Clinics of North America, *Equine Practice*, 1(1), 91.
- 細田達雄, 茂木一重, 金子忠恒, 阿部恒夫(1959): 家畜の初生児黄疸に関する研究. IV. 馬における非定型抗体の生成と消長, 農技研報, G18, 223-228.
- 細田達雄, 茂木一重, 金子忠恒, 渡辺誠喜(1959): 家畜の初生児黄疸に関する血清学的研究. I. 馬血球凝集原および溶血原と初生児黄疸との関係ならびに非定型抗体の存在について, 農技研報, G16, 87-60.
- YOKOHAMA, M. KONDOH, T. AKASHIMA, T. OHWA, Y. and AMANO, T. (1998): Specific monoclonal antibody to antibodies causing equine neonatal isoerythrolysis, *Anim. Genet.*, 29, 1:30.