

# ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) によるロタウイルスの検出について

山西 重機・山本 忠雄・高樹 正浩・安藤 忠司\*

## I 緒 言

1973年, Bishop の報告<sup>1)</sup>以来, ロタウイルスの検出は電子顕微鏡法が一般的方法として定着し, 我々も1978年以來この方法によって乳幼児下痢症の原因調査を実施している。しかし, この方法は観察者の視覚に頼る部分が大きく, 粒子数の少ない場合, 陰性判定の可能性もあり, また, 数値で定量的に表現することが難しく, 我々は, 1971年 Engvall と Permann が報告<sup>2)</sup>して以来, 感度のよいことで多くのウイルス抗体測定法に応用されている ELISA を検討し, 流行時のロタウイルス検出に応用し, 電顕法とともに充分利用し得ることを確認したのでその概要を報告する。

## II 材料と方法

1) 被検材料の咽頭ぬぐい液および糞便は, 感染症サーベイランス小児科定点を受診した乳児嘔吐下痢症もしくは, 他の下痢症患者より採取したものを使用した。

2) ELISA の手順については, 我々がさきに報告<sup>3)</sup>したヘルペス抗体測定法に準拠し, 表1のとおりである。

3) 抗ロタウイルス血清は, 予研松野博士より分与された Nebraska calf diarrhoea virus (NCDV) と MA 104 (アカゲザル腎) 細胞を用い, 高MOI 接種で CPE が全面におこる48時間経過後, 超音波処理をおこない, 5,000 rpm 30分粗遠心, その上清について, 40,000 rpm 2時間遠心し, その沈渣について20%~60%塩化セシウムに重層, 35,000 rpm over night, PBS で24時間透析したものを免疫用抗原とした。

うさぎを免疫動物とし, Freund のコンプリート, アジュバント (DIFCO) を用い, 免疫粘着赤血球凝集反応 (IAHA) による力価測定で 40,960~81,920 倍の抗体価のものを得た。

### 4) 抗ロタウサギ血清の精製

プレートコーティングとペルオキシダーゼ標識に必要な抗ロタウサギ 1 g G の精製は, 抗ロタウサギ血清を硫酸分画し, Sephacryl S - 200 カラムクロマトグラ

フィで, 図1の結果を得, 280 nm OD 値からの計算値で, 蛋白量は, F-1 (6.23 mg/ml), F-2 (0.47 mg/ml), F-3 (0.31 mg/ml) であり, プール 1 g G として F-1 を使用することとした。

5) 抗ロタウサギ 1 g G 分画へのペルオキシダーゼ (東洋紡) の標識については, Wilson と Nakane の方法<sup>4)</sup>に準拠し, Sephacryl, S - 200 カラムクロマトグラフィーで, 図2のように分画した。この方法では OD, 403/OD, 280nm 比が 0.3~0.6 の時, 最適と報告し, フラクション No. 139~160 (F-1) 0.352, No. 161~175 (F-2) 0.143 であるので, F-1 を凍結保存し, 以下の ELISA の実験に供した。

6) 糞便からのロタウイルス粒子の抽出精製は, Bishop の方法<sup>1)</sup>に準拠し, 電子顕微鏡観察は, 1%酢酸ウラン溶液でネガティブ染色し, 100 S 型電子顕微鏡 (日本電子) を用いた。

表1 ELISA の手順

|  |  |
|--|--|
| プレート (Immulon II Flat Bottom Plates - Dynatech 社)          |  |
| 抗ロタウサギ 1 g G のコート (100 $\mu$ l/well) 1 次抗体                 |  |
| 4°C over night   |  |
| 洗 浄 (PBS-T, 3 回)   |  |
| 抗原の反応 (100 $\mu$ l/well) 糞便乳剤                              |  |
| 37°C 1 時間  |  |
| 洗 浄 (PBS-T, 3 回)   |  |
| ペルオキシダーゼ標識抗ロタウサギ 1 g G の反応 (100 $\mu$ l/well) 2 次抗体        |  |
| 37°C 1 時間  |  |
| 洗 浄 (PBS-T, 3 回)   |  |
| 基質の添加 O-phenyldiamine (100 $\mu$ l/well) (室温 1 時間)         |  |
| 反応の停止 4-N-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (75 $\mu$ l/well) |  |
| 吸光度の測定   |  |
| OD 490 nm/570 nm 測定  |  |

\* 阪大微研観音寺研究所

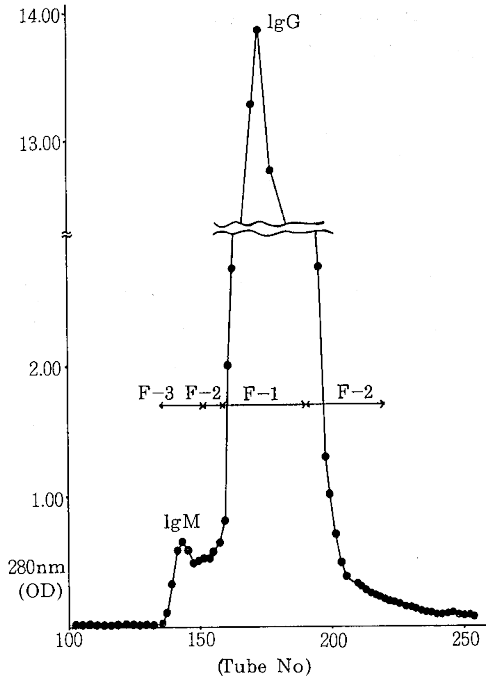


図1 抗ロタウサギ1gGの精製

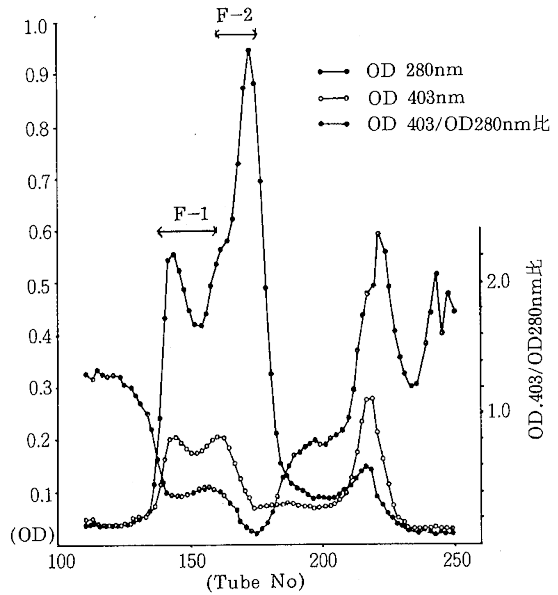


図2 ベルオキシダーゼ標識抗ロタウサギ1gG分画

### III 結 果

#### 1) ELISAの検討

第一次抗体として使用する抗ロタウサギ1gGのコーティング量については、図3、図4に示したとおりで、

プレート吸着量は、 $\times 800$  (1gG量  $36.91 \mu\text{g}/\text{ml}$ )  $\sim$   $\times 51,200$  (1gG量  $0.58 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) の希釈倍数の間で飽和していると考えられ、以後の実験で吸着させる量は、最大希釈倍数に余裕を考慮し、 $10,000$ 倍 (1gG量  $1.48 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) に希釈して使用することとした。

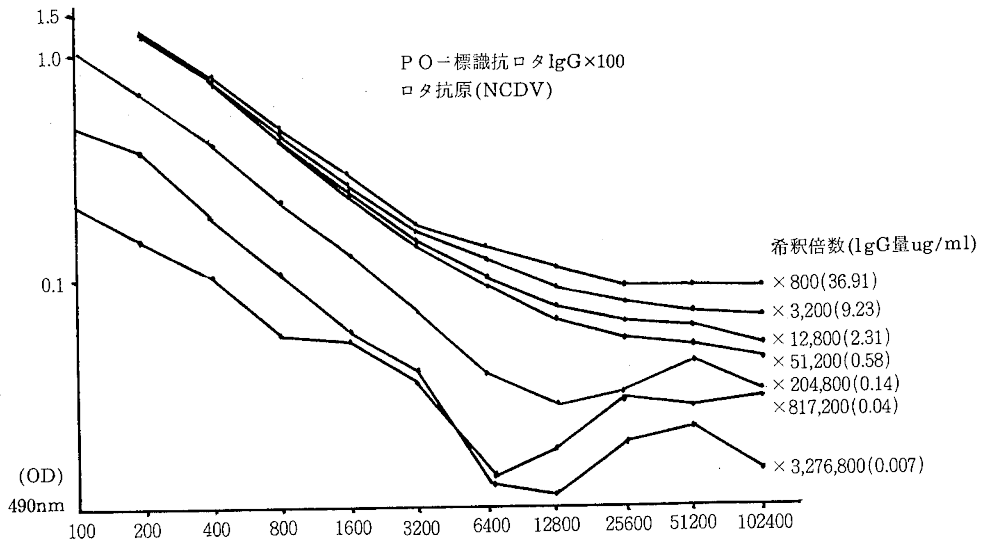


図3 抗ロタ1gGのコーティング量の検討

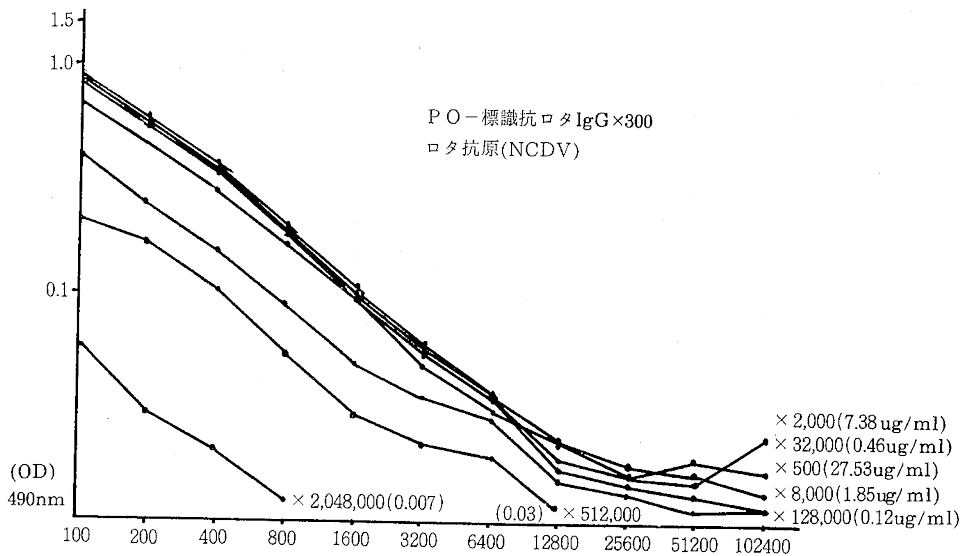


図4 抗ロタ1gGのコーティング量の検討

ペルオキシダーゼ標識抗ロタウサギ1gGの使用濃度については、図5のとおりで、抗原のDose response curveの直線域が広いこととプレートへの非特異的吸着量の少ないことを考え、 $\times 160 \sim \times 640$ の希釈域で使用可能と考えられ、以後の実験は、200倍で用いた。

2) ELISAによるロタウイルスの検出について  
陽性材料と陰性材料を $\times 100$ より、 $\times 51,200$ まで希釈して比較したのが、図6で患者からの分離ロタウイルスもNCDVも同様の結果となった。

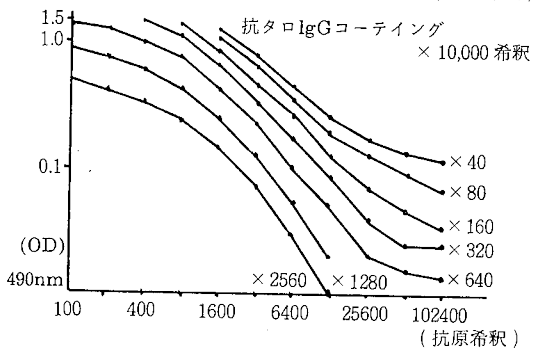
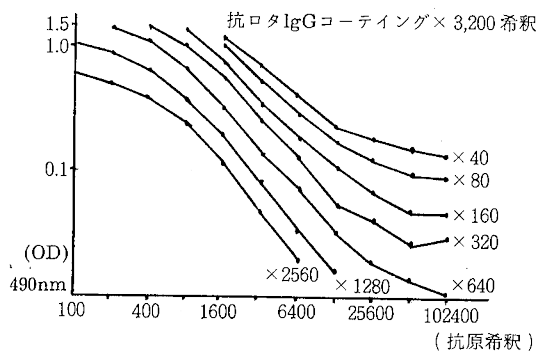


図5 PO-標識抗ロタ1gG量の検討

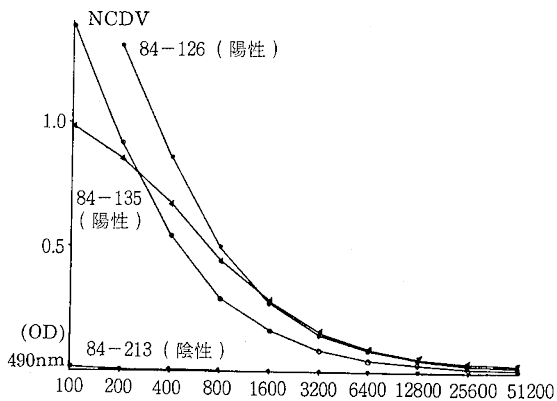


図6 陽性材料と陰性材料の比較について

また電子顕微鏡で確認した糞便材料陽性88例、陰性46例、カリシウイルス2例、アデノウイルス11例についてELISAによって検討を試み、表2のような結果をえた。

電顕法でロタウイルス陽性例のもので、ELISA(-)と判定されたものが、5例(5.7%)、また陰性例のもので、ELISA(+)が6例(13.1%)にみられた。

なお、他のウイルスの検討でアデノウイルス陽性例で1例(9.1%)がELISA(+)となった。

表2 電顕法とELISAの比較について

| EM         | ELISA         | ロタウイルス (+)    | ロタウイルス (-) | 計 |
|------------|---------------|---------------|------------|---|
| ロタウイルス(+)  | 83<br>(94.3%) | 5<br>(5.7%)   | 88         |   |
| ロタウイルス(-)  | 6<br>(13.1%)  | 40<br>(86.9%) | 46         |   |
| カリシウイルス(+) | 0             | 2<br>(100%)   | 2          |   |
| アデノウイルス(+) | 1<br>(9.1%)   | 11<br>(90.9%) | 11         |   |

また、OD値からみると、図7のとおりで、電顕法での粒子数に比例し、Cut off 値は、0.035 とすることが適当と考えられる。

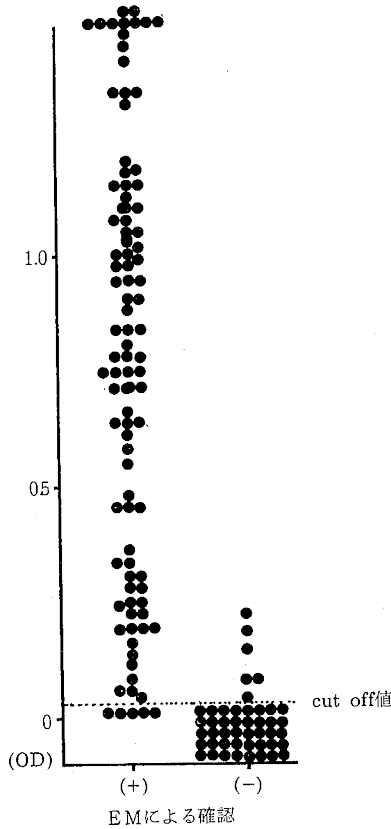


図7 電顕法とELISAの比較

3) ELISAによる咽頭からのロタウイルスの検出

表3に示すように乳児嘔吐下痢症患者では、60例中38例(63.3%)に呼吸器系の症状を認め、電顕法によりウイルス粒子の検出を試みたが確認できず、このことは粒子数に関係すると考え、今回ELISAでロタウイルスの検出を試みた結果は、図8のとおりで、OD値0.035をこえるものはなく、40例すべて陰性であった。

表3 ロタウイルス下痢症の臨床について

| 症 状       | 患 者 数 | %     |
|-----------|-------|-------|
| 発 熱(>37°) | 29/60 | 48.3  |
| 嘔 吐       | 44/60 | 73.3  |
| 下 痢       | 60/60 | 100.0 |
| (白 色 便)   | 32/60 | 53.3  |
| 呼 吸 器 症 状 | 38/60 | 63.3  |
| 脱 水 症 状   | 14/60 | 23.3  |
| 発 疹 症 状   | 7/60  | 11.6  |

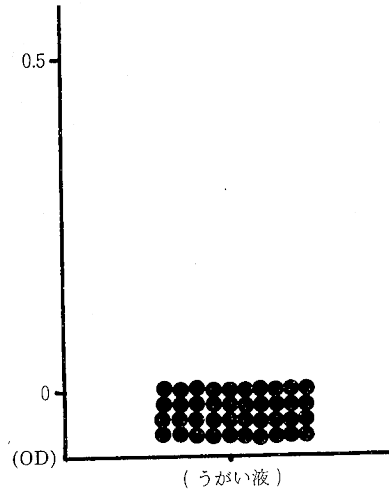


図8 咽頭からのロタウイルスの検出

IV 考 察

ロタウイルスの検出法は、Bishopら<sup>1)</sup>の電子顕微鏡による確認以後、Radioimmunoassay(RIA),ELISA, Solid phase aggregation of coupled earthro-tination(RPHA),LX(ラテックス凝集反応)による方法が開発され使用されるようになり、なかでも、設備、熟練度などから容易で迅速診断可能な方法としてYolkenの報告<sup>2)</sup>以来、ELISAは広く検討され、応用されている。

今回我々は、WilsonとNakaneの方法で抗ロタウサギ1g G中にペルオキシゼ標識を試み検討の結果、実験に使用することができ、その有用性を確認することができた。

結果は、電子顕微鏡でロタウイルスを確認したもので88例中5例(5.7%)がELISA(-)で、また、ロタウイルス陰性材料の46例で6例がELISA(+)となり、他のウイルスでは、アデノウイルス陽性のものが、1例(9.1%)ELISA(+)となった。

今回免疫に使用したウイルスは、NCDV(ウシロタウイルス)で、ヒトロウイルス、また、他のウイルスで

## 文 献

検討していないが、浦沢ら<sup>6)</sup>によるとNCDVとSAII (サルロタウイルス)とのヒトロタウイルスの検出比較でELISA-SAIIではhomologousのSAIIウイルスに対してのみならずheterologousのNCDVに対しても高い感度を示したのに対し、ELISA-NCDVの検出感度は劣ると報告しているが、電子顕微鏡で陰性例がELISA(+)となる場合があり、これは粒子数の少ない材料の見のがし例、また電顕法で検出不能のウイルスサブユニット抗原をELISAで検出する可能性も考えられ、またその反対例では非特異反応の存在、また電顕観察の粒子確認の際に誤認した場合などが考えられるが総体的にELISAは微量のウイルス抗原を検出することができ、勝島ら<sup>7)</sup>の報告のように電顕法より検出率が高いが、同じように下痢症をおこす他の粒子を同時に確認することはできない。

また現在他に報告はみないが乳児嘔吐下痢症患者で同時に呼吸器系の症状を呈しているものから咽頭ぬぐい液を採取し、咽頭からのウイルス分離をELISAで試みたが全例陰性でロタウイルスを確認することはできなかった。しかし呼吸器系症状を呈するものが患者の63.3%存在することから、咽頭からのウイルス排泄は当然考えられ、糞便より粒子数は少く電顕法では不可能であったが感染から検体採取までのウイルス排泄の時間的要素も考慮に入れるとELISAでもって検出することも可能であると考え、今後は使用ウイルスをhomologousのヒトロタウイルスにかえて検討したいと考える。

- 1) Bishop, R. F., Davidson, G. P., Holmes, I. H. & Ruck, B. J.: Virus particles in epithelial cell of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis. *Lancet*, 2:1281-1283, 1973.
- 2) Engvall, E. and Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8: 871-874, 1971.
- 3) 山西重機・吉原丘二子・山本忠雄: 県下のHSV抗体保有とELISAによる検討, 香川県衛生研究所報, 11: 79-82, 1982.
- 4) Wilson, M. B., and Nakane, P. K.: Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. *Immunofluorescence and Relating Staining Techniques*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 1978.
- 5) Yolken, R. H., Kim H. W., Clem, T.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis. *Lancet*, ii, 263-266, 1977.
- 6) 浦沢 价子, 古屋宏二, 谷口孝喜, 浦沢正三, : Enzyme linked Immunosorbent Assay法によるヒトロタウイルスの検出. *臨床とウイルス*, 8: 88-92, 1980.
- 7) 勝島矩子, 矢崎 棗, 坂本美千代, 五十嵐直子, 糞便中ヒトロタウイルス検出法の比較, *臨床とウイルス*, 11: 69-73, 1983.