

# ろ紙片使用による微量血の日本脳炎ウイルスELISA抗体価の測定

山本忠雄・山西重機・高樹正浩・高木光生<sup>※</sup>

## I はじめに

Engvall & Perlman<sup>1)</sup>によって開発されたELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)法は、従来常用されていた血清学的検査法と比較して迅速性、簡便性、定量性および感度の点で優れており、多くのウイルス感染症の血清学的診断に応用されて来ている。<sup>2)~10)</sup>日本脳炎ウイルス感染の血清学的検査には、赤血球凝集阻止(HI)反応、中和(NT)反応、補体結合(CF)反応が用いられていたが、Igarashi et al.<sup>11)</sup>は抗体価の測定にELISA法を応用した。

日本脳炎の防疫に関しては、ワクチン接種と共に、流行監視の立場から、毎年ブタの抗体保有状況を調査している。他方、地域住民の抗体保有状況を把握することも、日本脳炎発生予測の面に役立つものと考えられる。このような調査には、多数の検体を扱う血清学的検査が行われる。したがって、ELISA法の応用は能率的且つ実用的である。しかし、集団を対象とする血清学的検査には、常に血液採取から血清分離、さらにその保存に至るまで、各段階において多数の検体を処理する煩雑な過程が存在している。Konishi & Yamaoka<sup>12)</sup>はELISA法の反応時間の短縮による迅速測定法により微量全血の使用を検討し、従来の分離血清を用いるELISA法(こゝでは常用ELISA法と呼ぶ)と比較して、測定値には高い相関があると報告している。その報告の中で、全血吸収ろ紙から抗体を溶出し、溶出液を血清の代りにELISA法に用いる方法を記載しているが、非特異的反応が現われたり、また、測定値に変動があると述べている。我々は代謝異常検査用採血ろ紙を応用し、さらに血液吸収部分をパンチャーを用いて円板状ろ紙片として切り抜き、ELISAプレートの穴に直接挿入して抗体を溶出すると同時に抗原抗体反応を行わせる微量血測定法を考案した。この測定法をELISA法(ろ紙片)と呼ぶ。本論文では、ELISA法(ろ紙片)の測定条件および抗体価の減少を防ぐろ紙の保存法について述べ、さらに、他の抗体価測定法と比較

を行い、相関を検討したので報告する。

## II 材料および方法

### 1. 被検血清および採血ろ紙片の作製

香川県衛生研究所および<sup>(財)</sup>阪大微研観音寺研究所の職員43名から静脈採血を行い、血清を分離して被検血清としてフリーザーに凍結保存した。一方、採血時に20 $\mu$ lの血液を代謝異常検査用採血ろ紙C(東洋ろ紙製)に吸収させ、2日間高温多湿の場所を避けて暗所で自然乾燥した。また、目的によっては100 $\mu$ lの血液を採血ろ紙に吸収させた。乾燥後のろ紙は紙封筒に入れ、さらにビニール袋に入れて、フリーザーの中で保存した。この保存条件が確立されるまでは、実験は採血後ろ紙の乾燥を待って直ちに行った。採血ろ紙は、検査に当ってパンチャーで直径3mmに打ち抜き、小円板状のろ紙片とした。このろ紙片はELISAプレートの穴に入れるのに適当な大きさであった。

### 2. 抗体価の測定

常用ELISA法はIgarashi et al.<sup>11)</sup>の方法に従った。即ち、抗原にはホルマリン不活化日本脳炎精製濃縮原液(<sup>(財)</sup>阪大微研観音寺研究所製)を使用し、0.05M炭酸緩衝液(pH9.6)で160倍希釈した抗原をImmulon U型マイクロプレートに固相化した。プレートをPBS-Tween20で洗浄し、同じ緩衝液で100倍希釈した被検血清を加えて反応させた。酵素標識抗グロブリン抗体はペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgG(ヤギ)(E・Yラボラトリーズ社)を用い、吸光度の測定にはMICROELISA AUTO READER MR580(ダイナテック社)を使用し、490nmの波長で測定した。一方、Igarashi et al.<sup>11)</sup>の方法によりELISA抗体価を決定した血清を標準血清として用い、その吸光度とELISA抗体価の検量線を作成した。この検量線を基準にして、被検血清のELISA抗体価(常法)を求めた。

ELISA法(ろ紙片)では、プレートの穴に100 $\mu$ lの

※：<sup>(財)</sup>阪大微生物病研究会観音寺研究所

希釈液を入れておき、この中に血液を吸収させたろ紙片を入れて、抗体を溶出すると同時に抗原抗体反応を行う。溶出方法については本文中で述べる。反応1時間後ろ紙片を除去し、その後は常法に従い反応を進める。採血ろ紙に20 $\mu$ lの血液を吸収させると、直径約8mmの円形に拡がる。この部分からパンチャーを用いて3個のろ紙片を打ち抜くことが出来る。計算上1個のろ紙片には約2.8 $\mu$ lの血液が含有されている。これを100 $\mu$ lの希釈液に入れて溶出を行うと、90倍の希釈血清に相当することになる。(採血用ろ紙使用説明書に従い算出)。したがって、吸光度からELISA抗体価(ろ紙片)を求めるには、上記100倍希釈血清について得られた検量線をそのまま利用した。

HI抗体価は厚生省の伝染病流行予測調査検査術式<sup>13)</sup>に従って測定した。NT抗体価は鶏胎児細胞単層培養上の50%ブラック減少法<sup>14)</sup>によって測定した。

### III 成 績

#### 1. ELISA法(ろ紙片)の測定条件

(1) ろ紙片からの抗体溶出: ELISAプレートの穴に希釈液を加え、その中に採血ろ紙片を入れて1時間保温した。表1に示す如く、方法Iは反応時間中振とうを行わなかった場合、方法IIはろ紙片を入れた時に1分間振とうする場合、方法IIIは反応の中間で1分間振とうする場合、方法IVはIIとIIIを組み合わせた場合である。夫々8

名の採血ろ紙片について、各溶出方法毎に5個のろ紙片を用いて反応を行った。表1には測定値の平均値(M)と変動係数(CV)を示した。方法Iでは変動係数は5.19から23.52と拡がりが大きく、方法IIでも6.56から15.66の値を示した。方法IIIおよび方法IVでは変動係数の拡がりは夫々4.79から12.28および4.37から12.58であり、近似していた。以後の実験には、方法IVに従ってプレートの振とうを行った。

(2) ろ紙片切り取り部位: 血液はろ紙に浸み込んで、円形に拡がる。この場合、中心部と周辺部とで血液量に勾配があると、ろ紙片の切り取り部位により抗体価の変動が起こる可能性がある。また、採血量によって拡散後の血液密度が異なると、抗体価の変動の原因となる。この点を確かめるために、採血ろ紙に100 $\mu$ lの血液を吸収させ、形成した円形(直径約17mm)の血液吸収部の中心(C)と周辺(P)からろ紙片を作成した。夫々5個づつ8名の血液について測定し、その成績を表2に示した。周辺部の中心部に対する比P/Cをみるとほぼ1.0に近い。また、微量血(20 $\mu$ l)を吸収させた採血ろ紙からもろ紙片(S)を作製し、得られた測定値を上記の中心部(C)の測定値と比較した。その比C/Sはほぼ1.0であり血液量が微量であっても測定値にほとんど影響のないことが知られた。即ち、微量血の採血を行い、採血ろ紙の任意の部位からろ紙片を作製してもよいことが示された。

Table 1. Variations in absorbance values measured on each of eight blood samples by four procedures that elute antibodies from blood-absorbed filter paper discs

Blood sample No	Procedures for elution of antibodies							
	I		II		III		IV	
	M	CV	M	CV	M	CV	M	CV
1	0.551	5.19	0.553	6.56	0.695	4.79	0.634	4.75
2	0.467	7.30	0.465	7.94	0.569	9.49	0.530	6.17
3	0.302	9.64	0.343	10.50	0.421	5.15	0.344	9.24
4	0.290	15.66	0.381	8.50	0.400	12.28	0.330	8.36
5	0.195	7.74	0.230	7.83	0.291	8.59	0.222	4.37
6	0.146	11.23	0.154	14.55	0.215	5.35	0.153	10.39
7	0.122	23.52	0.113	15.66	0.121	12.07	0.108	8.61
8	0.118	16.69	0.071	15.63	0.116	10.69	0.093	12.58

Twenty  $\mu$ l of human whole blood were absorbed on a sheet of filter paper and brought to dryness. Three pieces of blood-absorbed paper disc (3 mm in diameter) per sheet were made with a punch, and total 5 paper discs per blood sample were placed one by one in wells of ELISA plate, which had been coated with Japanese encephalitis virus and received 100  $\mu$ l of the diluent solution per well. Incubation was performed for 1 hr at 37°C in an incubator. The following procedures were employed to elute antibodies from paper discs. I, no vibration; II, vibration for 1 min at time 0; III, vibration at 30 min; and IV, vibration at time 0 and 30 min.

M: Mean of absorbance values measured

CV: Coefficient of variation represented in percent

**Table 2.** Comparison of absorbance values measured by the ELISA system using filter paper discs that were made in the central and peripheral parts of blood-infiltrated circles

Blood sample No	Absorbance values <sup>a</sup>			Ratio	
	C	P	S	P/C	C/S
1	0.374	0.431	0.391	1.15	0.96
2	0.292	0.293	0.271	1.00	1.08
3	0.193	0.192	0.175	0.99	1.10
4	0.218	0.241	0.206	1.11	1.06
5	1.432	1.446	1.441	1.01	0.99
6	0.583	0.609	0.529	1.04	1.10
7	1.392	1.409	1.451	1.01	0.96
8	0.973	1.032	0.905	1.06	1.08

a: Mean of measurements performed on 5 paper discs

C: Paper discs made in the central part of 100 $\mu$ l blood-infiltrated circles

P: Paper discs made in the peripheral part of 100 $\mu$ l blood-infiltrated circles

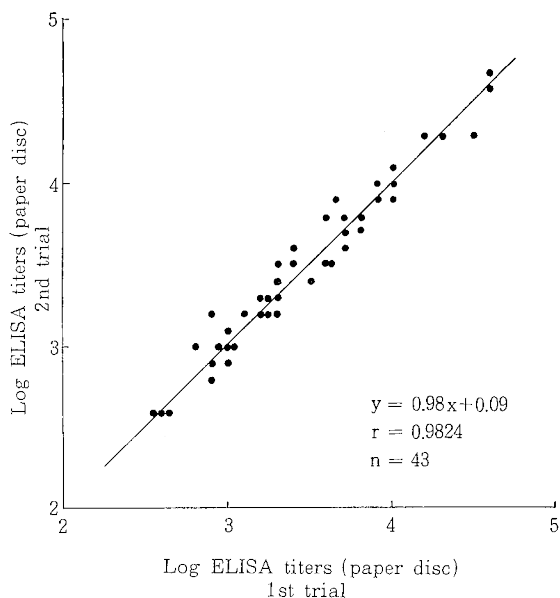
S: Paper discs made in 20 $\mu$ l blood-infiltrated circles

## 2. 採血ろ紙の保存法

血液を吸収したろ紙の保存方法として、フリーザー、冷蔵庫、および室温（10℃～25℃）に保存する方法を選んだ。保存直前、保存後10日、30日および60日に夫々ろ紙を取り出して、ろ紙片を作製し、ELISA法で抗体価を測定した。表3の如く、フリーザーの中に保存した場合は、採血後60日を経ても抗体価の低下はみられなかった。これに対し、冷蔵庫内で保存した場合は、保存後10日で5%、30日で11%、60日で16%の抗体価の減少を来たした。室温で保存した場合には、抗体価の減少はさらに大きく、保存後10日で21%、60日で37%減少した。

## 3. ELISA法（ろ紙片）の再現性

採血ろ紙に吸収させた43名の血液について2回繰返してELISA抗体価の測定を行った。検体の採血ろ紙はフリーザーに保存したものを使用した。図1に示す如く、2



**Fig. 1.** Reproducibility of the paper disc system of ELISA expressed as correlation in antibody titers between two trials

回の測定値は極めて高い相関性を示し、相関係数は0.98であった。即ち、ELISA法（ろ紙片）は再現性の高い測定法であることが示された。

## 4. 種々の測定法間の相関性

ELISA法（ろ紙片）に用いた検体の保存血清（採血時に分離し凍結保存した血清）について、常用ELISA法、HI法、NT法により抗体価を測定し、ELISA法（ろ紙片）で測定した抗体価との相関性を調べた。図2にはELISA抗体価（常法）とELISA抗体価（ろ紙片）との相関性を示してある。相関係数は0.94であり、高い相関性がある。図3にはHI抗体価とELISA抗体価（ろ紙片）との相関性を示してある。相関係数は0.91であった。図4にはNT抗体価とELISA抗体価（ろ紙片）との相関性を示してある。相関係数は0.85であった。表4の如く、ELISA抗体価

**Table 3.** Condition of storage of blood-absorbed filter paper

Storage in	ELISA titers (paper disc) assayed on day			
	0	10	30	60
Freezer	19,000 <sup>a</sup> (100) <sup>b</sup>	19,000 (100)	20,000 (105)	20,000 (105)
Refrigerator	19,000 (100)	18,000 (95)	17,000 (89)	16,000 (84)
Room	19,000 (100)	15,000 (79)	15,000 (79)	12,000 (63)

a: ELISA titers shown as the mean of measurements performed on 5 paper discs

b: Percent

(常法)とHI抗体価の間では相関係数0.93となり、高い相関性が認められた。しかしELISA抗体価(常法)とNT抗体価の間では相関係数0.87であり、また、HI抗体価とNT抗体価の間では相関係数0.81を示し、NT抗体価と他の方法による抗体価との間の相関はやゝ低い傾向にあった。

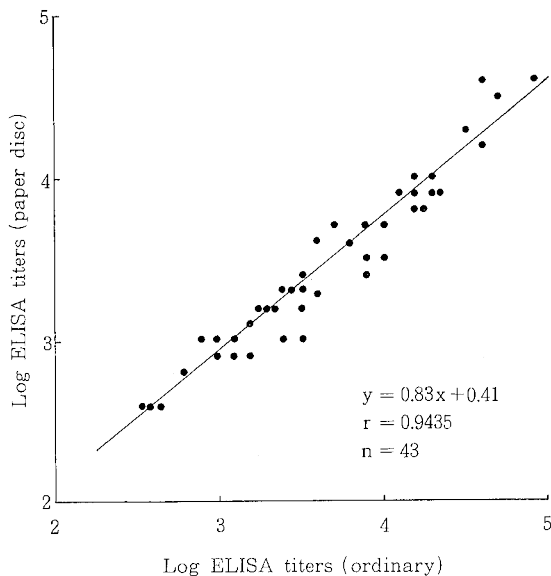


Fig. 2. Comparison between the ordinary system and the paper disc system of ELISA

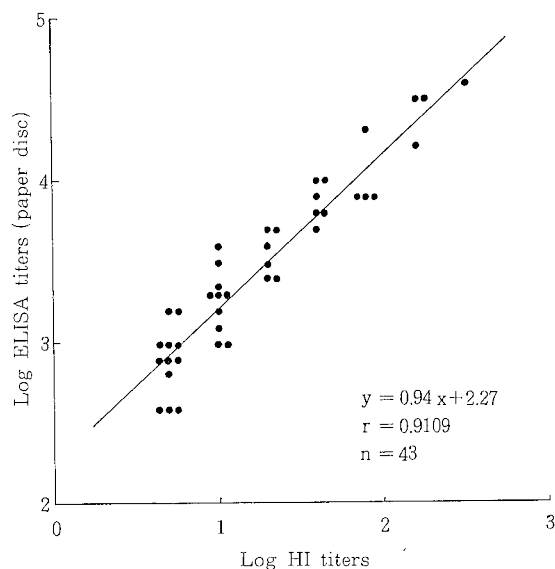


Fig. 3. Comparison between the hemagglutination inhibition test and the paper disc system of ELISA

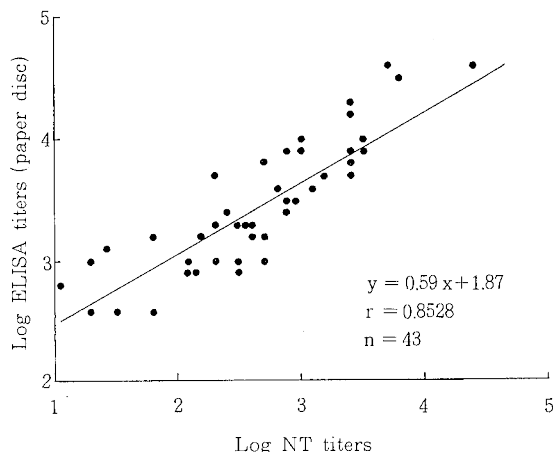


Fig. 4. Comparison between the neutralization test and the paper disc system of ELISA

Table 4. Correlation in antibody titers between various assay methods

	ELISA paper disc	ELISA ordinary	HI	NT
ELISA paper disc	0.98 <sup>a</sup>	0.94	0.91	0.85
ELISA ordinary	0.94	—	0.93	0.87
HI	0.91	0.93	—	0.81
NT	0.85	0.87	0.81	—

a: Correlation coefficient

#### IV 考 察

ELISA抗体価の測定に検体として血清を使用する通常の方法では、血清分離を行うために採血量の微量化は困難であり、したがって静脈採血を行う必要がある。このような操作を省くため、微量全血を用いる方法がある。Konishi & Yamaoka<sup>12)</sup>はELISA法の迅速測定法の実験において、検体として2 $\mu$ lの全血を使用しており、血清を使用した場合と比較して、測定値との間に高い相関性が得られたと報告している。我々も検体として2 $\mu$ lの全血を使用してELISA抗体価を求め、ELISA抗体価(常法)およびHI抗体価と比較したところ高い相関性のあることを認めている。<sup>15)</sup>

微量全血を使用したELISA抗体価は、他の測定法による抗体価との相関性が高く、しかも採血した血液をそのまま使用するため有用な測定法である。しかし、一度に多数の検体を採取する場合には、検体の保存が困難である。我々は検体保存が可能なる紙採血法に着目し、血液吸収る紙片をそのままELISA法に応用する方法を考案した。この測定法の特徴は、検体として血液吸収る紙片を

直接プレートの穴に挿入し、抗体を溶出すると同時に抗原抗体反応を行う点にある。この際、抗体溶出のパラッキから生じる誤差を出来るだけ少なくする必要がある。そのため反応過程中、プレートに振とうを加えることによって抗体溶出を促進し、測定値の変動係数を小さくすることが出来た。

検体として血液吸収ろ紙を使用することから、採血ろ紙に吸収させる血液量、並びにろ紙片切り取り部位による抗体価への影響を調べた。採血量20 $\mu$ lと100 $\mu$ lの間には抗体価には差はなく、またろ紙片切り取り部位による抗体価への影響もほとんど生じないことが判明した。

次に採血ろ紙の保存方法について検討したところ、フリーザー中で保存しておけば、少なくとも2ヶ月間はELISA抗体価に影響のないことが示された。室温(10 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C)および冷蔵庫内に保存した場合には時間の経過とともにELISA抗体価が減少する傾向が認められた。この傾向は冷蔵庫内保存より室温保存で大きかった。北住<sup>16)</sup>らは、ろ紙血を使用して受身血球凝集反応でHBs抗体を測定する研究を行っているが、採血ろ紙の保存について室温(18 $^{\circ}$ C~27 $^{\circ}$ C)および4 $^{\circ}$ Cではいづれも検体採取して3週間後まで測定値に顕著な変動が認められなかったと述べている。この実験における採血ろ紙の保存状態については明らかでないが、我々の実験においては採血ろ紙をビニール袋に入れて密封状態で保存したが、乾燥剤を使用しなかった。このような保存状態が抗体価の減少の理由かも知れない。

ELISA法(ろ紙片)の再現性については、2回の測定値の相関を比較したところ、相関係数0.98の極めて高い値が得られ良好な再現性のあることが示された。また常用ELISA法とELISA法(ろ紙片)との間にも高い相関性のあることが判明した。

種々の抗体測定法相互間の相関性については、ELISA抗体価(ろ紙片)とHI抗体価との間に高い相関がみられた。ELISA抗体価(常法)とHI抗体価との間にも同程度の相関がみられた。Bundo et al<sup>17)</sup>および山崎<sup>18)</sup>らはヒト血清を用い、またKonishi & Yamaoka<sup>19)</sup>はブタ血清を使用して夫々相当高い相関性が得られたと報告している。それらの相関係数は我々の得た値とはほぼ同程度のものであった。

ELISA抗体価(ろ紙片)とNT抗体価との間の相関性については相関係数0.85であり、またELISA抗体価(常法)とNT抗体価との間の相関係数は0.87を示した。さらにHI抗体価とNT抗体価との相関係数は0.81であり、NT抗体価との相関係数はいづれも低い値を示した。七條<sup>20)</sup>らはNT抗体価とELISA抗体価(常法)との間には相関係数0.94の高い相関性があると報告している。この

点は我々の成績と多少相違するが、NT抗体価の結合するepitopeとその他の血清反応に関与するepitopeは必ずしも同じではないので、NT抗体価との相関性の低いのは理解し得ることである。

以上述べたように、ろ紙片を用いるELISA法は極めて精度の高い測定法である。さらに微量血を用いて抗体価の測定が可能のため、毛細血管(耳朶、手指頭、足指等)を用いることが出来る。したがって静脈採血が困難な新生児、乳幼児および小実験動物の抗体価測定にも応用出来る。また、一度に多数検体を採取しても保存が可能であること、測定に際しても常用ELISA法より検体処理の面でさらに迅速簡便である。我々の考案した測定法はこのような実用性に富むものである。

稿を終えるにあたり、終始御指導並びに論文の御校閲を賜った徳島大学医学部ウイルス学教室の内田孝宏教授に深甚なる謝意を表します。

## 文 献

- 1) Engvall, E. & Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry.*, 8:871-874, 1971.
- 2) Voller, A. & Bidwell, D. E.: Enzyme-immunoassay for antibodies in measles, cytomegalovirus and after rubella vaccination. *Br. J. Exp. Pathol.*, 57:243-247, 1976.
- 3) Gilman, S. C. & Docherty, J. J.: Detection of antibodies specific for herpes simplex virus in human sera by the enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Infect. Dis.*, 136:S286~293, 1977.
- 4) Yolken, R. H., R. G. Wyatt, G. Zissis, C. D. Brandt, W. J. Rodriguez, H. W. Kim, R. H. Parrrott, J. J. Urritia, L. Mata, H. B. Greenberg, A. Z. Kapikian and R. M. Chanock.: Epidemiology of human rotavirus types 1 and 2 studied by enzyme-linked immunosorbent assay. *N. Engl. J. Med.*, 299:1156-1161, 1978.
- 5) Bishai, F. R. & Galli, R.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies to influenza A and B and parainfluenza type 1 in sera of patients. *J. Clin. Microbiol.*, 8:648-656, 1978.
- 6) Forghani, B., Schmidt, N. J. and Dennis, J.: Antibody assay for varicella-zoster: Comparison of enzyme immunoassay with neutralization, immune adherence hemagglutination and complement fixation. *J. Clin. Microbiol.*, 8:545-552, 1978.
- 7) 南嶋陽一, 広瀬美和子: ELISAによるサイトメガロウイルス抗体の測定. *臨床とウイルス*, 8:404-408, 1980.
- 8) 水谷裕迪, 水谷弘子, 長根尾京子: ELISAのムンブ

- スにおける実用性と問題点. 臨床とウイルス, 8:408-410, 1980.
- 9) 村岡良昭, 加藤富保, 玉川重徳, 南谷幹夫: ムンプス抗体価測定における測定法の比較検討. 臨床とウイルス, 8:410-412, 1980.
  - 10) Popor-Kraupp, T.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for mumps virus antibodies. *J. Med. Virol.*, 8:79-88, 1981.
  - 11) Igarashi, A., Bundo, K., Matsuo, S., Makino, Y. & Lin, W. J.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on Japanese encephalitis virus. I. Basic condition of the assay on human immunoglobulin. *Trop. Med.*, 23:49-59, 1981.
  - 12) Konishi, E. & Yamaoka, M.: Rapid enzyme-linked immunosorbent assay of whole blood for detection of antibodies to Japanese encephalitis virus. *J. Virol., Meth.*, 7:21-28, 1983.
  - 13) 厚生省公衆衛生局保健情報課: 日本脳炎. 伝染病流行予測調査検査術式, 60-73, 1978.
  - 14) 大谷明, 奥野剛: 日本脳炎ウイルス. ウイルス実験学各論, 国立予防衛生研究所学友会編, 丸善, 東京, p.124-162, 1967.
  - 15) 山本忠雄, 山西重機, 岡崎秀信: ELISA法(酵素免疫測定法)による日本脳炎抗体の測定. 香川県衛生研究所報, 11:74-78, 1982.
  - 16) 北住武昭, 桜林郁之介, 河合忠: 濾紙片採血(blood disc)法によるHBs抗原, 抗体の微量測定の研究. 臨床病理, 25:1259-1262, 1981.
  - 17) Bundo, K., Matsuo, S., Igarashi, A.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on Japanese encephalitis virus. II. Antibody levels in patient sera. *Trop. Med.*, 23:135-148, 1981.
  - 18) 山崎謙治, 上羽昇, 峯川好一: 酵素免疫測定法(ELISA)によるヒト血清中の日本脳炎ウイルス抗体の検出. 大阪府立公衆衛生研究所研究報告(公衆衛生編), 20:65-69, 1982.
  - 19) Konishi, E. & Yamaoka, M.: Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for quantitation of antibodies to Japanese encephalitis in swine sera. *J. Virol. Meth.*, 5:247-253, 1982.
  - 20) 七條明久, 三舟求真人, 帆足喜久雄, 井上桂子, 甲斐国弘: ELISAプレート法による日本脳炎ウイルス抗体価測定Ⅱ. 健康人血清の抗体測定へのELISAプレート法の応用. 臨床とウイルス, 10:135-137, 1982.