

# Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA法) によるロタウイルス抗体測定について

山西 重機・山本 忠雄・高樹 正浩

## I はじめに

1973年, Bishopの報告以来<sup>1)</sup>, ロタウイルスについては, 種々な抗原抗体検出法が検討され, 抗原については, 電子顕微鏡観察法, 逆受身凝集反応 (R-PHA) ラテックス凝集反応, 組織培養など応用され確認も容易となってきた。ELISA法を利用したロタウイルスの抗原検出法については, 先に報告<sup>2)</sup>したが, 今回我々は1971年 Engvallと Perlmannによって開発<sup>3)</sup>されて以来, 感度が高く操作が容易なことでいろいろな方面に利用されているELISA法を抗体測定法に応用し, 従来の抗体測定法にかわって, ウシ, ブタ, ヒトの各動物について検討し十分に疫学調査等に利用し得ることを確認したのでその概要について報告する。

## II 材料と方法

### 1) 被検ウシ血清

香川県下で飼育されている乳牛でブルセラ検査に供するために採血したもので生後4~6年で香川県東部家畜保健衛生所より分与をうけた。

### 2) 被検ブタ血清

香川県下で飼育されていた生後6~7ヶ月のと殺豚から採血し実験に供した。これは日本脳炎流行予測事業の対象とされているものである。

### 3) 被検ヒト血清

香川県感染症サーベイランス事業の病院定点を受診した下痢症およびその他の患者より採血したものと, 病院検査部の残余の血清を用いた。

### 4) 抗体ELISA法の手順

#### 【抗原】

NCDV (Nebraska calf diarrhoea virus)をMA 104細胞 (アカゲザル腎) に高MOI接種でCPEが全面におこる48時間後, 超音波処理をおこない, 5,000 rpm 30分低速遠心し, 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%から60%の塩化セシウム連続密度勾配遠心法で35,000 rpm, over nightし, ウイルスバンドを回収しPBSで24時間透析したも

のを吸着抗原とした。

(ペルオキシダーゼ標識抗体)

ウシは, HRP O標識抗ウシ IgG うさぎ 1 g G, ブタは, HRP O標識抗ブタ IgG うさぎ IgG, ヒトは, HRP O標識抗ヒト IgG ヤギ IgG, (いずれもカッペル社, USA)を用いた。

#### 【抗体検出方法】

表1に示したとおりで, プレートに抗原を4℃で一晩吸着し, Tween 20加PBS (PBS-T)で洗浄後PBS-Tで適当希釈したそれぞれの動物血清を加え37℃1時間反応させ再びPBS-Tで洗浄した後, それぞれ動物のHRP O標識抗体を加え37℃1時間反応させ, さらにPBS-Tで洗浄, 基質として, 0.05% 0-phenylendiamineを加え遮光して室温1時間静置し, 4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で反応を停止させたのち, 波長490nmでO.Dを測定した。

表1 抗体-ELISAの手順

プレート (イムロンIIフラットプレート ダイナテック)
抗原 (NCDV) のコート (100μl/well)
4℃ over night
洗 浄 (PBS-T)
検査材料 (血清) を加える (100μl/well)
37℃ 1時間
洗 浄 (PBS-T)
ペルオキシダーゼ標識抗ヒト 1 g G ヤギ 1 g G (100μl/well)
37℃ 1時間
洗 浄 (PBS-T)
基質 (0-phenylendiamine) (100μl/well)
室 温 1時間
反応停止 4N-H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (75μl/well)
吸光度の測定
OD 490nm/570nm

### 5) 免疫粘着血球凝集反応 (IAHA)

#### 【抗原】

NCDVをMA 104細胞で増殖, 超音波処理をおこない5,000 rpm 30分低速遠心その上清を抗原として使用した。

【抗体検出方法】

カオリン処理をした被検血清を2段階希釈し、至適濃度の抗原を加え、振とう後、37℃1時間反応させ、新鮮モルモット血清を加え、再び振とう後、37℃温浴中で40分間反応させ、Dithiothreitol (DTT) と、ヒトO型赤血球浮遊液を加え、さらに振とう、そして赤血球が沈降するまで室温に静置し判定した。

6) アセトン肝末の作製

カニクイザルの肝臓に等量のPBSを加え、ホモジナイズし、4℃2,000rpm30分遠心し、上清をすて適量のPBSを加えて攪拌・遠沈を3回くりかえし、最後の沈渣に等量のPBSを加え、攪拌しながらアセトンを加え30分間攪拌し、ろ紙をしいたブフナー漏斗に移して吸引しながらアセトンを通し、37℃で乾燥し、肝末を細く砕いて4℃で保存して使用した。

III 結 果

1) 吸着抗原濃度の検討

図1は、抗原使用濃度の検討をしたもので、標準と決めたヒト血清を100倍から2段階で25,600倍まで希釈し、またベルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGヤギIgGを2,500倍、5,000倍、7,500倍、10,000倍で用い(検討結果5,000倍)、抗原を50倍から8,000倍まで希釈して検討した。O・D値の測定範囲また直線域の長さから使用できるのは200倍と決め、以後の実験に供した。ELISA値の算出法は、標準ときめた血清の100倍から12,800倍までの希釈をおこない、100倍血清希釈を1280 ELISA値として、12,800倍血清希釈の10 ELISA値までの8段階の標準曲線をつくった。

また同様にして、ウシ、ブタの吸着抗原、HRPOの標識抗体の濃度、ELISA値の算出法をそれぞれ定め

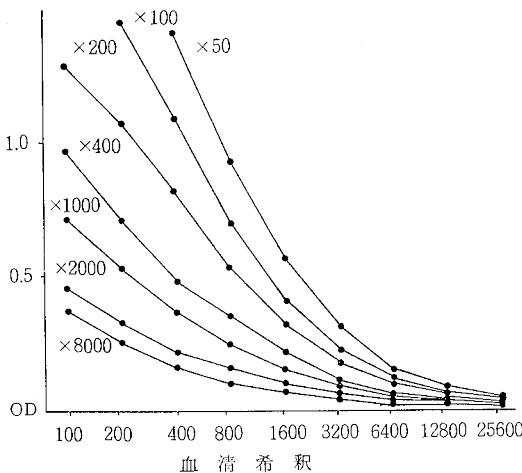


図1 抗体-ELISAの抗原濃度の検討

実験に供した。

2) 特異反応の検討

非特異反応をみたのが図2で、NCDVを接種していないMA104細胞のみをNCDV培養細胞精製方法と同様に処理をし、同様の希釈でプレートに抗原吸着させ、ともに標準曲線を測定したものである。

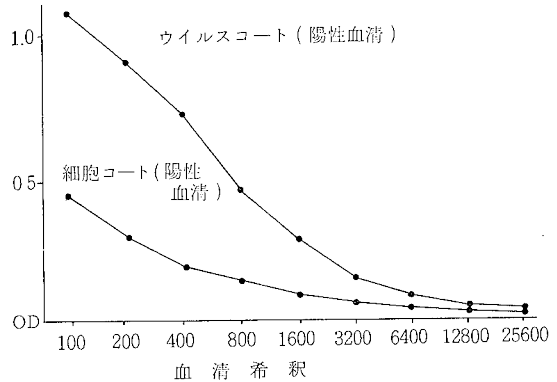


図2 非特異反応の検討

ウイルスの存在しない細胞のみの吸着でO・D値が0.43となりウイルスを含まない細胞のみでELISA値が出ることがわかった。この対策として細胞成分に対するものが血清中に存在すると考え、吸収操作で除去することを試みたのが、図3で検討したのは、カニクイザルアセトン肝末を血清に対し1/2量加えて4℃ over nightし、低速遠心し、その上清を検体としたものと、アカゲザル

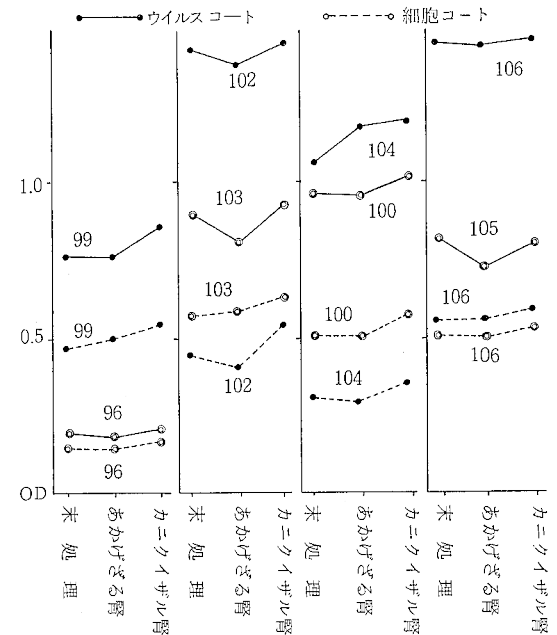


図3 非特異反応の検討(細胞による吸収)

腎臓は、MA104細胞を大量培養し100分の1に濃縮し血清と等量に加え、4°C over nightし、低速遠心しその上清を検体としたものの二種類で、実線がウイルス吸着、点線が細胞吸着で8検体について示してあるが、OD値はほとんど変動せず、細胞によって吸収できるものは存在しなかった。

3) ヒト血清中のロタウイルス抗体のELISA価、IAHA価の相関をみたのが図4で、X軸にELISA価、Y軸にIAHA価をとり危険率1%以下で0.767の有意の相関がみられた。

この方法を用いて、ヒト血清123件についてロタウイ

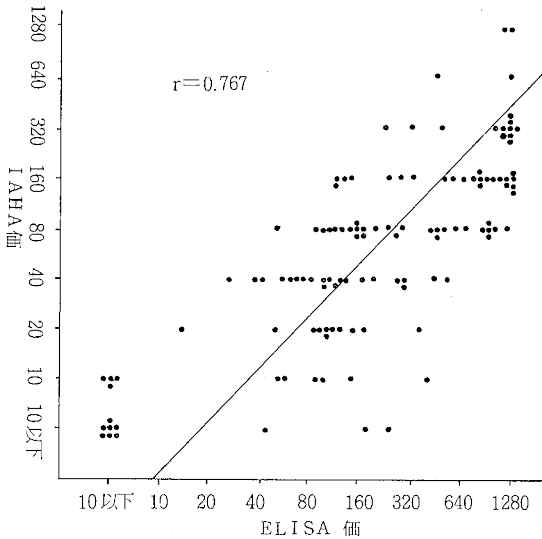


図4 ELISA価とIAHA価の相関(ヒト)

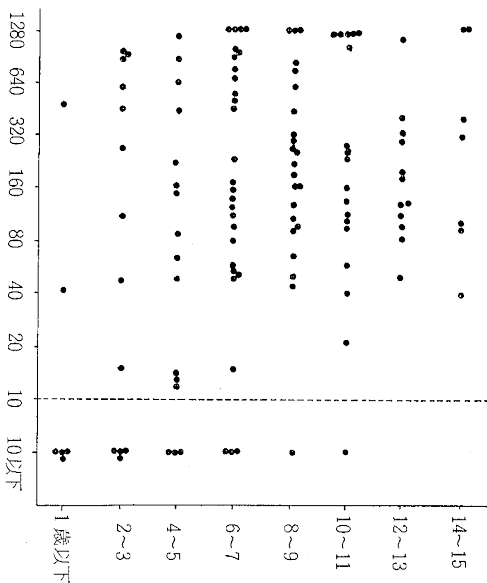


図5 年齢別ELISA抗体価保有率について

ルスに対するELISA価を測定し年齢分布をみたのが図5で、Cut off値を10ELISA価に決め、1才で33.3%、2~3才で69.2%、4~5才で81.2%、6~7才で89.2%、8~9才で95.6%、10~11才で94.4%、12才以上で100%となった。

4) ウシ血清中のロタウイルス抗体のELISA価とIAHA価の相関をみたのが図6で0.707の有意の相関があった。

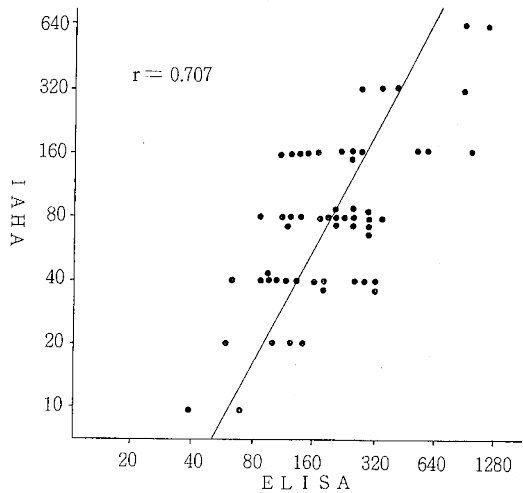


図6 ウシ抗体の相関

5) ブタ血清中のロタウイルス抗体のELISA価とIAHA価の相関をみたのが図7で0.829の有意の相関があった。

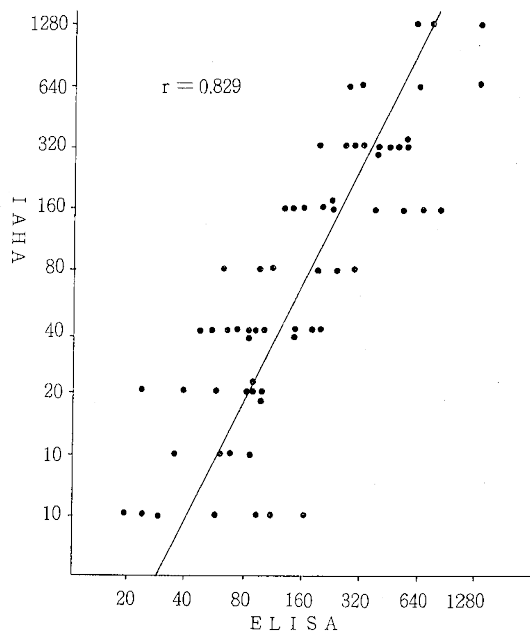


図7 ブタ抗体の相関

## IV 考 察

ロタウイルスの抗体測定法については、補体結合反応 (CF), I A H A法, 中和抗体測定法, P H A法, E L I S A法等が開発され利用されているが, C F法は感度が低くまた中和抗体測定法はウイルスによっては, C P Eを指標としておこなうため陰性限界がはっきりせず, そのため, R-P H Aを用いてロタウイルスの中和の有無を判定する方法<sup>4)</sup>も報告されているが, なかでもE L I S A法については感度が高く容易に測定できることからロタウイルスも含めいろいろなウイルスに应用されている。今回の我々のE L I S A法の手順については, 先に報告<sup>5)</sup>したヘルペス抗体測定法に準拠しておこなったが従来から非特異反応をおさえるため, H R P O標識抗体希釈液にウシ血清アルブミンを1%に加えて利用してきたがヒト, ブタではうまく反応するが, ウシ血清中の抗体測定の場合, 抗体と反応して, O D値測定範囲限界まで高く出る傾向があり, 測定不能でこのため他にみられないが卵アルブミンを利用しておこなった。

今回用いた抗原は, 連続密度勾配遠心法による精製をおこなったが細胞成分の除去が不完全でM A 104細胞を抗原とする反応に陽性結果が出るため, この対策として, カニクイザルアセトン肝末およびM A 104細胞の大量培養によるアカゲザル腎細胞による吸収操作をおこなったが加えた細胞によるO D値の低下はみられず, 吸収除去できず, 特異的なロタウイルスに対する抗体は, ウィルス抗原を吸着させたE L I S A法のO D値から細胞抗原を吸着させたE L I S A法のO D値を除去したものを特異的抗体とすることとして各種動物に應用して従来の抗体測定法のI A H A法と比較してみた。

ヒト120検体, ウシ57検体, ブタ64検体についてI A H A法とE L I S A法との相関についてみるとそれぞれ危険率1%以下で, 0.767, 0.707, 0.829, の有意の相関がみられ従来の検査法にかわって十分に利用できることがわかった。

ただI A H A法はC Fなどにくらべると2~3管高く出で感度は高いが, 前期産生のI g Gに対してaffinityが弱いことで1ヶ月以内くらいは反応しないか, もしくは低く出ることがわかっており<sup>6)</sup>このことで図上のプロットは全体に右方へ移動している。またI A H A抗体陰性もしくは近い抗体価でE L I S A価が高く出で感度のよいことが推定できる。

またE L I S A価によるヒトの抗体年齢分布を測定した報告は少ないが, 曲ら<sup>7)</sup>の長崎地方での成績の出生直後から2ヶ月までは母親からの移行抗体のI g Gを検出して80%以上の高率に認められるがその後1才で38%,

1才以降徐々に上昇し2才以後で80%のプラトーに達するとの報告と初期の段階ではよく類似するが県下の調査では, 抗体保有が80%に達するのは, 4才になってからであった。

県下で4年前に調査した<sup>8)</sup>I A H A価の年齢分布, 生後6ヶ月から1才で16.6%, 1才で35.7%, 4才で70.5%の結果と類似した傾向であった。

また同時に抗体を調べたウシでは, 年齢が4~6才の乳牛で100検体全てE L I S A価陽性であり, また生後6~7ヶ月のブタでは100検体中E L I S A価陰性11検体を含んでいた。

このことは使用した抗原がN C D Vのためウシに対して強く反応し, そのため吸着抗原, H R P O標識抗体をヒト血清に使用の場合より希釈培数を高くする必要があった。

また杉山らの犬におけるロタウイルス抗体調査<sup>9)</sup>ではI A H A価ではあるが578検体中129頭(22.3%)が陽性を示し同種ではないが低率で, ウシ, ブタが高率の結果となった。

今回の測定は, H R P OにI g Gを標識したものを利用し, I g G抗体を調査したが, 標識する抗体をかえることによって容易にI g M抗体測定<sup>10)</sup>をすることができ, 今後は, ロタウイルスの血中I g Mと糞便中のI g A抗体についても検討したいと考える。

## V 文 献

- 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) 山西重機, 山本忠雄, 高樹正浩: E L I S A (Enzyme-linked immunosorbent assay)によるロタウイルスの検出について. 香川県衛生研究所報, 12: 79-83, 1983.
- 3) Engvall, E. & Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (E L I S A). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8, 871-874, 1971.
- 4) 梅津幸司, 白地良一, 千葉良, 海老名卓三郎, 佐藤昭夫, 石田名香雄: R P H A法を用いたヒトロタウイルスの中和抗体価測定法. *医学のあゆみ*, 127, 1071-1073, 1983.
- 5) 山西重機, 吉原丘二子, 山本忠雄: 県下のH S V抗体保有とE L I S Aによる検討. 香川県衛生研究所報, 11: 79-82, 1982.
- 6) 井上 栄: I A H A試験法の特長. *臨床とウイルス*, 9: 53-56, 1981.
- 7) 曲 泰弘, 田中智之, 伊藤端子, 出口雅経, 小池通夫,

宮本博行：ELISA法による糞便中ヒトロタウイルスの検出および血中抗体価の測定。臨床とウイルス，9，211-217，1981。

8) 山西重機：香川県下におけるウイルス性下痢症とその疫学。感染症学雑誌，58，774-783，1984。

9) M. Sugiyama., N. Minamoto., T. Kinjo., & A. Hasimoto., : A Serological Survey on

Rotavirus Infection in Dogs by Immune Adherence Hemagglutination Test. Jpn. J. Vet. Sci, 46, 767-771, 1984.

10) 山西重機，山本忠雄，高樹正浩：Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA法)によるブタ血清中の日本脳炎ウイルス抗体検出に関する研究。岡山医学会雑誌，97，25-29，1985。