

# 採血部位による日本脳炎ウイルスELISA 抗体測定値の比較検討

山本忠雄・三木一男・山西重機

## I はじめに

ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay) 法では、一般に血清(静脈採血による分離血清)を検体として使用している。著者は検体採取の容易さ、検体量の微量化、検体の保存性並びに抗体測定により迅速化および簡便化を図る目的で血液吸収ろ紙片を検体として、そのままELISA法に応用する測定法を考案し既に報告<sup>1)</sup>した。

この測定法の特徴は、検体として直径3mmの血液吸収ろ紙片(以後ろ紙片という)を直接プレートの穴に挿入し、抗体成分を溶出すると同時に抗原抗体反応を行う点である。

日本脳炎ウイルスの抗体測定において、HI法とELISA法(静脈血を吸収させたろ紙片使用)との間に高い相関性のあることについては既に報告<sup>1)</sup>した。

今回の実験は、検体採取の容易な耳朶血を日本脳炎ウイルス抗体測定に応用する目的で行ったもので、上述した測定法により静脈血と耳朶血をそれぞれ採血ろ紙に吸収させておき、それを検体として抗体価を求め、両検体使用による測定値の比較検討を行ったものである。

## II 材料と方法

### 1 被検材料

昭和61年11月、某大学生56名を対象として肘部から静脈採血を行い、採血後直ちに、約50  $\mu$ l の血液を代謝異常検査用採血ろ紙C(東洋ろ紙製)に吸収させた。一方同上対象者の耳朶にランセットを使って出血させ、直ちに代謝異常検査用採血ろ紙C(東洋ろ紙製)に約20  $\mu$ l の血液を吸収させた。この両採血ろ紙は2日間高温多湿の場所を避けて暗所で自然乾燥した。乾燥後のろ紙は紙封筒に入れ、更にビニール袋に入れてフリーザーの中で保存した。測定に際して、吸血部をパンチャーで直径3mmのろ紙片に打ち抜き、これを被検材料とした。

### 2 抗体価の測定

ELISA法は、後述する部分を除いては、Igarashi et alの方法<sup>2)</sup>に従った。即ち抗原にはホルマリン不活化日本脳炎ワクチン精製濃縮原液(財)阪大微研観音寺研究

所製)を使用し、0.05M炭酸重炭酸緩衝液(pH9.6)で160倍に希釈した抗原を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る。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。

Igarashi et alの方法と一部異なる点は、検体として血清を使用するかわりにろ紙片を使用することによるもので、概要は次のとおりである。抗原を固相化しておいたプレートに希釈液を入れておき、このプレートの穴に検体として直径3mmのろ紙片を挿入し、抗体成分の溶出と同時に抗原抗体反応を行う点である。この場合に抗体成分溶出の均一化を図る目的で、ろ紙片を挿入した直後と、挿入30分後の2回プレートに夫々1分間づつ振とうを加えた。上述以外はIgarashi et alの方法に従った。

## III 成績

ろ紙片使用による静脈血並びに耳朶血の日本脳炎ウイルスELISA IgG抗体測定値の相関は図1に示すとおりである。回帰式は $y=0.98x+0.027$ で、相関係数は0.980であった。

静脈血を使用した場合、56名中ELISA IgG 価の最高値は72,000であり、同人の耳朶血におけるELISA IgG 価は62,000で、この値は耳朶血を使用したELISA IgG 価の最高値であった。静脈血を使用した場合、56名中ELISA IgG 価の最低値は300で、2名おり、同人の耳朶血におけるELISA IgG 価は200並びに400であった。このELISA IgG 価200は耳朶血を使用した場合の最低値であった。

## IV 考察

Engvall & Perlmann<sup>3)</sup>によって開発されたELISA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いる。<sup>4)~12)</sup>

## 文 献

- 1) 山本忠雄, 高木光生: 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, 感染症学雑誌, 59, 1135-1141, 1985.
- 2) Igarashi, A., Bundo, K., Matsuo, S., Makino, Y. & Lin, W. J.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on Japanese encephalitis virus. I Basic conditions of assay on human immunoglobulin, Trop. Med., 23: 49-59, 1981.
- 3) Engvall, E & Perlmann, P.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). quantitative assay of immunoglobulin G, Immunochemistry, 8: 871-874, 1971.
- 4) Voller, A. & Bidwell, D. E.: Enzyme-immunoassay for antibodies in measles, cytomegalovirus infection and after rubella vaccination, Br. J. Exp. Pathol., 57: 243-247, 1976.
- 5) 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.
- 6) Yolken, R. H., Wyatt, R. G., Zissis, G., Brandt, C. D., Rodriguez, W. J., Kim, H. W., Parrott, R. H., Urritia, J. J., Mata, L., Greenberg, H. B., Kapikian, A. Z. & Chanock, R. M.: Epidemiology of human rotavirus types I and 2 studied by enzyme-linked immuno-sorbent assay, N. Engl. J. Med., 299: 1156-1161, 1978.
- 7) Bishai, F. R. & Galli, R.: Enzyme-linked immuno-sorbent assay for detection of antibodies to influenza A and B and parainfluenza type I in sera of patients, J. Clin. Microbiol., 8: 648-656, 1978.
- 8) Forghani, B., Schmidt, N. J. and Dennis, J.: Antibody assay for varicella-zoster virus: Comparison of enzyme immunoassay with neutralization, immune adherence hemagglutination and complement fixation, J. Clin. Microbiol., 8: 545-552, 1978.
- 9) 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.
- 10) 水谷裕迪, 水谷弘子, 長根尾京子: ELISAのムンプスにおける実用性と問題点, 臨床とウイルス, 8: 408-410, 1980.
- 11) 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.
- 12) Popo-Kraupp, T.: Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for mumps virus antibodies, J. Med., 8: 79-88, 1981.

このELISA法を更に有用なものにするためろ紙採血法を導入し, 検体量の微量化を図った。検体量を微量化することにより, 毛細管血の使用が可能になる。

採血部位による血液成分等の差に関して, 赤血球数の他にヘモグロビン濃度や白血球数も静脈血では耳朶血より少く, 指頭血は静脈血に近い値を示す等といった記述がある。

このようなことを考慮して, 耳朶血(毛細管血)をELISA法に応用するに当たり, 静脈血との差の有無を調査した。その結果は図1に示すとおりで, 相関係数は0.980と大変高かった。

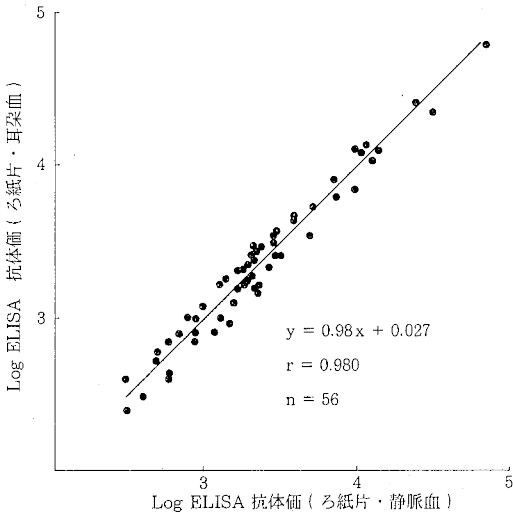


図1 ELISA抗体価(ろ紙片・静脈血)とELISA抗体価(ろ紙片・耳朶血)の相関性

今回のこの実験成績は著者が既に報告<sup>1)</sup>したろ紙片使用による日本脳炎ウイルスELISA抗体の再現性の実験成績(回帰式は $y = 0.98x + 0.09$ , 相関係数は0.982)と殆んど差が認められなかった。即ち今回の両検体使用による測定値の差は測定誤差範囲内と理解される。

以上のことから, ろ紙片使用による日本脳炎ウイルスELISA IgG抗体の測定に当って静脈血(肘部等)を使った場合と採血が容易な耳朶血を使った場合の測定値に差のないことが判明した。