

ELISA法(酵素免疫測定法)による日本脳炎抗体の測定

山本 忠雄・山西 重機・岡崎 秀信

I はじめに

近年開発されたELISA法は迅速性、簡便性、定量性、および感度の点で従来の血清反応に優る利点があるといわれている。

そこで (1)HI抗体価とELISA抗体価(血清使用),ろ紙採血法によるELISA抗体価(全血使用),そして微量採血法によるELISA抗体価(全血2μl使用)との相関,(2)ELISA法の再現性,(3)血清および全血の2段階希釈におけるODの比較等について調査したので報告する。

II 材料および方法

検体としては、人および豚の血液(血清又は全血)を使用し、検体の種類、希釈方法については表1に示したとおりである。ELISA法の測定はマイクロプレートを用いた間接法で行い、術式は五十嵐¹⁾らの方法に準拠した。測定法の概要については図1のとおりである。

微量採血法では5μl採血出来るマイクロピペット(毛細管)を用いて2μl採血し、プレートに100μl分注してあいた希釈液(PBS-T)の中に加えた。すなわち、全血を50倍希釈したものを検体とした。

ろ紙採血法は、ろ紙に血清量にして40μl吸着させ、これを4mlの希釈液の中に加え、血清量として100倍希釈にしたものを検体とした。

抗原は(財)阪大微生物病研究会観音寺研究所より分与されたホルマリン不活化日本脳炎精製濃縮ワクチン原液を使用した。ペルオキシダーゼ標識抗人IgGはEY.ラボ

表1 検体の種類並びに希釈方法

検体の種類	検体の希釈方法
血清	$\frac{\text{血清}(20\mu\text{l})}{\text{希釈液}(2\text{ml})} = 100\text{倍希液}$
全血	$\frac{\text{全血}(40\mu\text{l})}{\text{希釈液}(2\text{ml})} = 50\text{倍希液}$
全血(微量採血法)	$\frac{\text{全血}(2\mu\text{l})}{\text{希釈液}(100\mu\text{l})} = 50\text{倍希液}$
全血(ろ紙採血法)	$\frac{\text{全血(血清として}40\mu\text{l})}{\text{希釈液}(4\text{ml})} = 100\text{倍希液}$

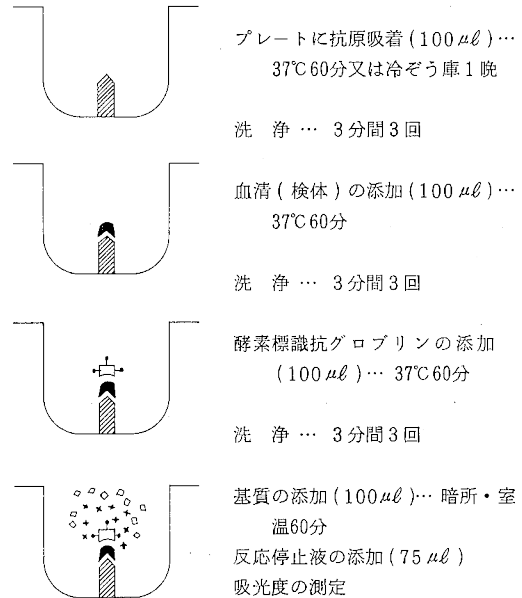


図1 ELISA抗体価の測定法(間接法)

ラトリズ社(USA)の製品を、ペルオキシダーゼ標識抗豚IgGはカッセル社(USA)の製品をそれぞれ使用した。

又HI抗体の測定は厚生省が「伝染病流行予測調査検査術式²⁾」に示す方法に準拠した。

III 調査結果

1. HI抗体価とELISA抗体価との相関

(1) 53名の人血清を用いたHI抗体価とELISA抗体価との相関は図2のとおりで、相関係数は0.835であった。

(2) 27頭の豚血清を用いたHI抗体価とELISA抗体価との相関は図3のとおりで、相関係数は0.798であった。

(3) 27名のHI抗体価とELISA抗体価(血清使用)との相関は図4のとおりで、相関係数は0.99であった。

(4) 27名のHI抗体価とろ紙採血法ELISA抗体価(全

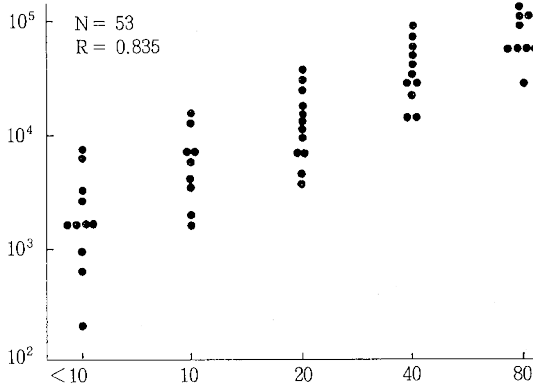


図2 HI抗体価とELISA抗体価との相関(人)

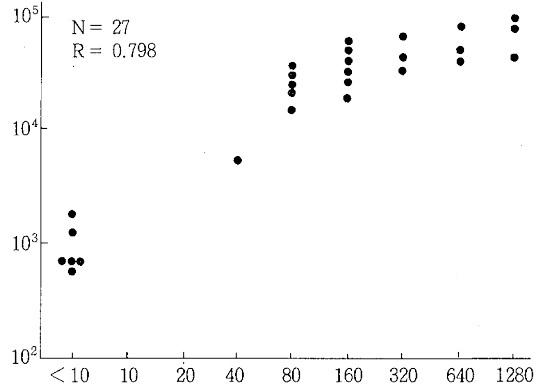


図3 HI抗体価とELISA抗体価との相関(豚)

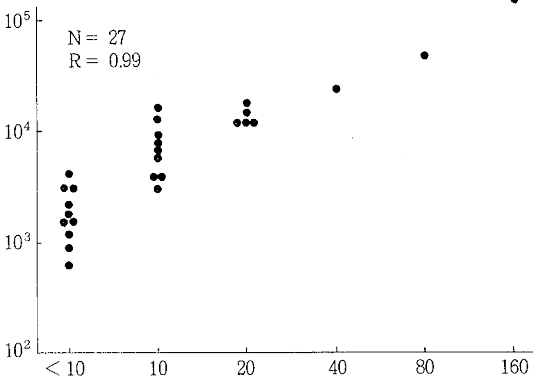


図4 HI抗体価とELISA抗体価との相関(人)

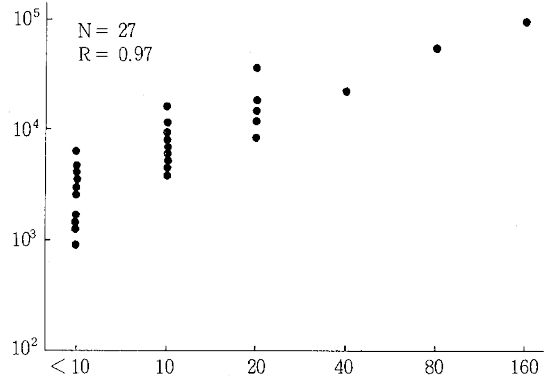


図5 HI抗体価とろ紙採血法によるELISA抗体価との相関(人)

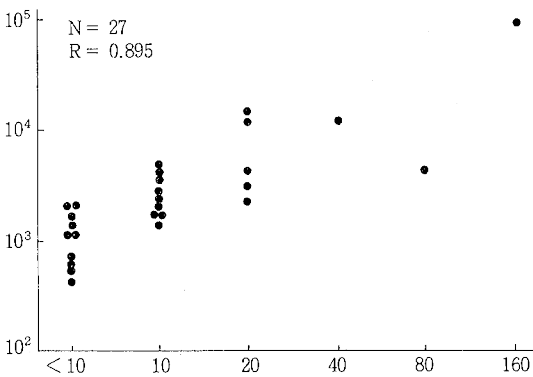


図6 HI抗体価と微量採血法によるELISA抗体価との相関(人)

血使用)との相関は図5のとおりであり、相関係数は0.97であった。

(5) 27名のHI抗体価と微量採血法ELISA抗体価(全血2 μ l使用)との相関は図6のとおりで、相関係数は0.895であった。

27名のHI抗体価と各種(血清使用、ろ紙採血法、微量採血法)ELISA抗体価との相関係数は図7のとおりであった。

2. ELISA法の再現性

52名の人血清を用いて、one point法並びにend point法でELISA法の再現について調べた結果は図8のとおりであった。

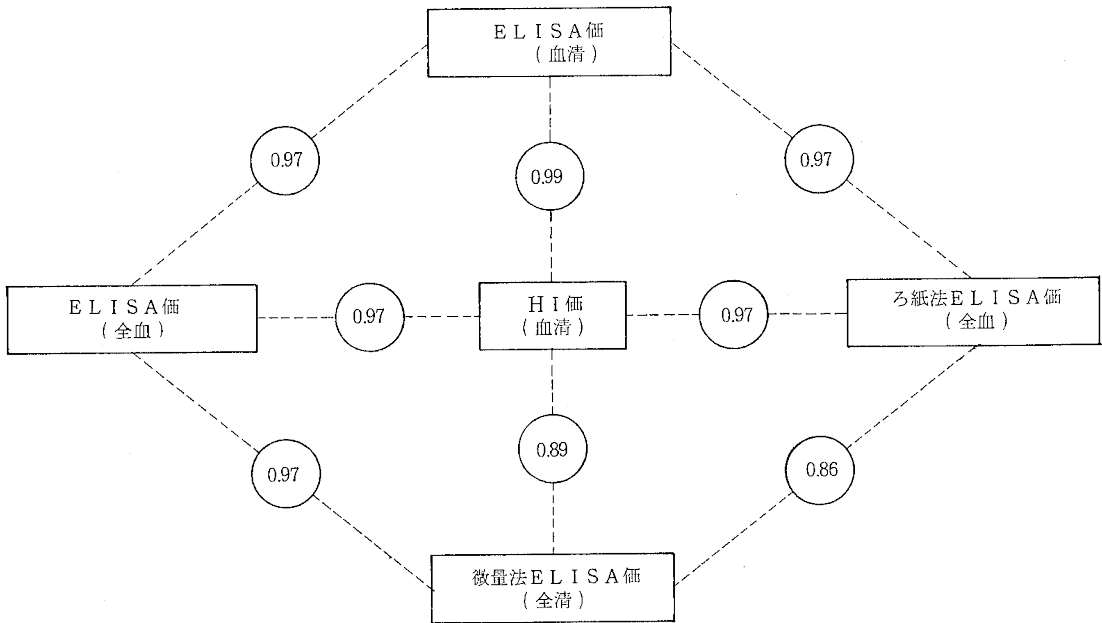


図7 HI抗体価とELISA抗体価との相関(27名)

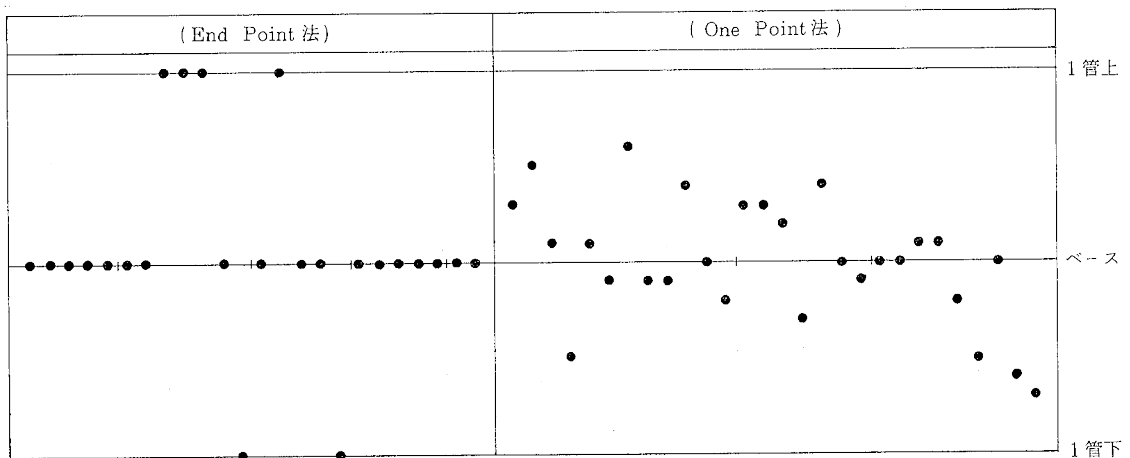


図8 ELISA法の再現性

3. 血清および全血の2段階希釈におけるODの比較
 HI抗体価が40倍であった人の血清および全血(ろ紙採血法を含む)の2段階希釈を行い、102,400倍まで希

釈した場合のODの比較成績は図9に示すとおりであった。

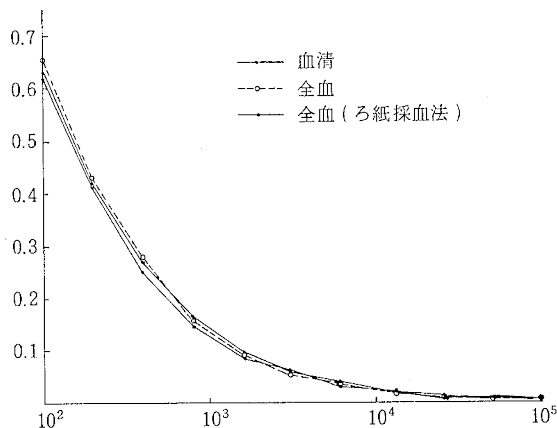


図9 血清並びに全血の二段階希釈におけるODの比較

4. 酵素反応の調整

今回の実験では、検体の希釈や酵素標識抗グロブリン

の希釈液として使用している洗浄液 (PBS-T) に窒化ソーダを全く添加せず使用した。その結果ODが全般的に高くなり、高い抗体価の検体はODが1.5以上になり測定することが出来なかった。

人の抗体価測定では、HI抗体価で320倍の標準陽性血清がやっと測定出来た程度で、これ以上の高い抗体価のものについてはODが高くなり過ぎて測定することが出来なかった。

豚の抗体価測定では、定められていた抗原の希釈倍率を更に4倍に希釈したところ、HI抗体価1,280倍の標準陽性血清を使用して測定することができた。

その後、洗浄液に0.01%の割合で窒化ソーダを加えたところ、HI抗体価で320倍までしか測定出来なかったものがHI抗体価で1,280倍まで十分に測定出来るようになった。

ELISA法では、酵素反応を調整し、ODを測定する必要がある。酵素反を調整する要素はいくつかあるが、洗浄液中の窒化ソーダの含有率の調節が好ましく、ついで抗原の希釈率の調節のように考えられる。

表2 HI法とELISA法の検査上の比較

項目	HI法	ELISA法
1 迅速性	1 血清の分離 2 非特異性物質の除去 (1晩)	1 抗原 (60分) 2 血清 (60分)
2 簡便性	3 抗原と反応 (1晩) 4 血清の非動化	3 標識グロブリン (60分) 4 基質 (60分)
3 微量検体の測定性 (ろ紙採血法)	4000 μ l	2 μ l (耳, 尾, 足の裏)
4 グロブリン分割の測定	間接的	直接的
5 実験用動物	必要	不必要
6 再現性	良好	良好

IV 考 察

1. HI法とELISA法の検査上の比較

(1) 迅速性, 簡便性

表2および図1に示したように、HI法では検査に最低48時間を要するが、ELISA法では6時間でよく、HI法の約1/8の時間で検査が可能である。なお小西らは検査に要する時間をまだまだ短縮出来ることを示唆している。

又ELISA法では全血を使用することが可能なため血清分離を行う必要がない等HI法より簡便である。

(2) 検体量の微量化

ELISA法は表2に示したとおり、微量採血法では2 μ lの全血で検査が可能でありHI法の約1/2000の検

体量で検査出来る。

検体量が少ないので静脈からの採血を行う必要もなく、耳翼からの採血で十分である。新生児のような場合は、足の裏から、実験動物であれば尾等、どこからでも容易に採血することができる。

ろ紙採血法の場合も微量採血法と同様に少量の検体でしかも採血が容易である。

以上述べた点はELISA法が今後普及していく上で大変有利な条件である。

(3) グロブリン分画の測定

ELISA法ではIgM, IgG, IgA等のグロブリンを直接測定することが可能であり、特にIgMが直接測定出来ることは各種感染症の早期診断を行う上で非常に意義深い点である。

(4) 全血使用による検査

血清並びに全血の2段階希釈におけるODの比較成績は図9に示したとおりである。人血液の血球成分率は約40~50%位であるので、今回は全血の50倍希釈をもって血清の100倍希釈と対応させて実験を行った。

2段階希釈にあけるそれぞれの検体のOD曲線はそれぞれよく一致している。従って微量の採血量でしかも血清分離の必要もない簡便な全血を使用する検査方法は今後十分活用されるものと思われるが、もう少し実験を重ねてより多くのデータを集める必要がある。

IV 結 論

ELISA法はHI法との相関性が高く、しかも採血が容易な微量採血法や、ろ紙採血法との間にも高い相関性を示した。

又再現性についても、従来の血清抗体の測定で、一般

的に誤差範囲とされている上下1管以内におさまるよい成績が得られた。検査方法の統一化までには多くの検討課題が残されているが、迅速性・簡便性・微量検体での測定性、採血の容易性、グロブリン分画の測定による早期診断、安全性等多くのすぐれた点を有しており、今後益々普及するものと考えられる。

VI 文 献

- 1) 五十嵐ら：Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) on Japanese Encephalitis Virus. I. Basic Conditions of the Assay on Human Immunoglobulin, *Tropical Medicine*, 23 (1), 49~59, March, 1981.
- 2) 厚生省公衆衛生局保健情報課，伝染病流行予測調査検査術式，60-73, 1978.
- 3) 小西英二ら：日本脳炎ウイルス生態学研究会会報，第14号，9~10, 1982.