

# 県下のHSV抗体保有とELISAによる検討

山西 重機・吉原丘二子・山本 忠雄

## I 緒 言

母子保健上重要な問題ともなっている周産期感染症の一つである単純ヘルペスウイルス(HSV)は、広く世界に分布、常在して無症状の状態ヒトと共存している慢性感染ともなっている。

HSVは、1型と2型の亜型に分けることができ、1型は口唇ヘルペス、2型は性器ヘルペスから分離されることが多いが、我々は主として感染症サーベイランス定点からの検査材料で、小児を中心として咽頭ぬぐい液からのウイルス分離と各年令別の中和抗体価の保有状況また最近微量抗原もしくは抗体検出法として注目されている酵素抗体法(ELISA)との相関について検討したのでその概要について報告する。

## II 材料と方法

1) ウイルス分離材料の咽頭ぬぐい液ならびに血液は各感染症サーベイランス定点より送付されたもので、分離材料の保存培地としては、ビールインヒュージョンブロスに0.2%ウシ血清アルブミン、0.5%ゼラチン添加のものを用い、採取後直ちに検査室搬入を原則とした。

2) 使用細胞は、初代アフリカミドリザル腎細胞(GMK)を用い、常法により単層形成細胞に除菌処理後の検査材料を接種し、2週間観察した。典型的なヘルペス様CPEの出現したものについて、蛍光抗体法でもって同定した。

3) 中和抗体価の測定は、マイクロプレートで単層形成したGMK細胞にトランスフェプレートで中和させた材料を移行させ、4日間培養し、50%のCPEのひろがり指標として判定した。攻撃ウイルスは、HSV-1型(HF株)、HSV-2型(UW-268株)、100 TCID<sub>50</sub>を用いた。

4) HSV-ELISA抗原はGerard<sup>1)</sup>らの方法により、HSV(HF, UW-268)をVero細胞に高MOIで接種し、30分間吸着、24時間静置培養し、PBSをもって洗浄後、培養瓶(200cm<sup>2</sup>)に対し、3mlのPBSを加え、細胞を集め凍結融解および超音波で細胞破壊し、10,000rpm 10分遠心後上清を-80℃で保存し、ELISA抗原とした。

対照抗原としては、HSVを接種しないVero細胞を上記と同様の方法で処理後、ELISA抗原とした。

5) ELISAの手順は、五十嵐<sup>2)</sup>の方法に準拠し適当希釈のHSV抗原をプレート(ダイナテック、イムロンプレート)にコーティング(4℃, over night)。

PBS-Tで洗浄後、1%アルブミン-PBSを加え室温30分、その後同様に洗浄、血清を加え37℃、1時間反応させ洗浄、その後、ペルオキシダーゼ標識抗体を加え37℃1時間反応させ、洗浄、基質は0.05% O-phenylenediamineを用い、光を遮光して室温1時間放置後、4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で反応を停止させ、490nmの波長で吸光度を測定した。

## III 結 果

### 1. HSVの分離状況について

図1に示すとおりで季節的な関係はみられず、流行型をとることもなかったが年によって集中して分離される傾向にあるが、ほぼ年間を通して分離することができた。

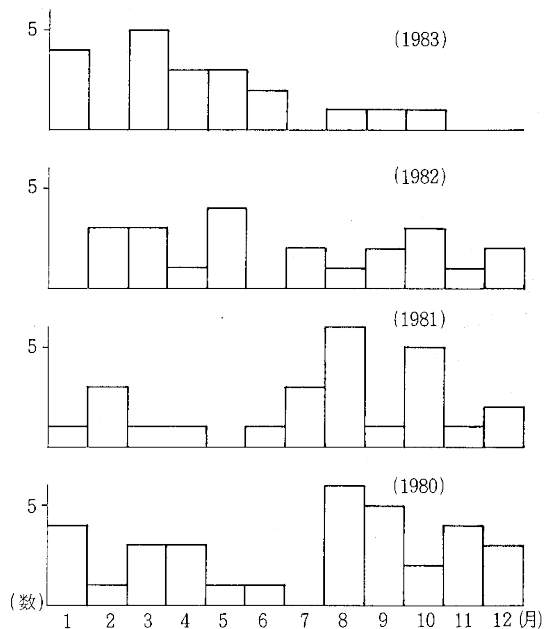


図1 HSVの分離状況について

分離された患者の疾患名は、アフター性口内炎（ヘルペス歯齦口内炎）が58.2%と大部分を占め、呼吸器系疾患22.9%、発疹性疾患、無菌性ずい膜炎がそれぞれ3.8%その他の疾患11.3%であった。

## 2. 県下の中和抗体価の保有状況

HSV-1とHSV-2型の抗原に対する抗体保有の状況については、図2のとおりで、1983年6月から10月までに採取した357血清についてみたもので、両型とも1才で10.5%の陽性で一般の感染症のように年齢が増すごとに抗体保有率の上昇という結果にならなかった。しかし、25才以上の年齢層では、80.0%の陽性であった。

HSV-2型に対しても、HSV-1型と同傾向であり、このことは、両型の抗原交差部分が大きく、その為とも考える。

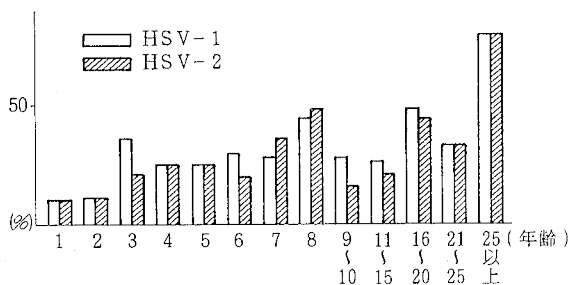


図2 HSV中和抗体保有状況について

## 3. 個々の血清のHSV-1とHSV-2に対する中和抗体価について

25才以上の高年齢層90例、15才以下の低年齢層112例について、それぞれの抗体価をプロットしたのが図3と図4である。HSV-1の感染による交差のためのHSV-2型の上昇ではないHSV-2型の感染によると考えられる抗体獲得は、図中の斜線の左上に散在するプロットで感染の可能性が考えられ、25才以上では7例(7.7%)みられ、15才以下では1例(0.9%)であった。

## 4. HSV-ELISA条件の検討

### ① 抗原中の細胞成分の検討

HSV-ELISA 抗原中に宿主細胞成分が含まれ、これが反応に与える影響をみるために、抗原と同様に宿主細胞を処理して作製した対照抗原を使用して標準血清（中和抗体価128倍の患者5人の血清を混合）の2段階希釈のO.Dを示したのが図5で、たて軸はO.D. 横軸は血清希釈倍数（以下同じ）で、今回の実験では、反応に影響のない誤差の範囲に含まれると考え、無視し以降の実験に供した。

HSV-2型についても同様におこない同傾向の結果

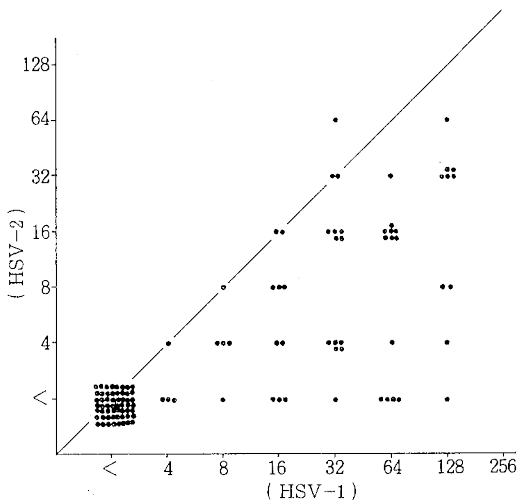


図3 個々のHSV-1とHSV-2に対する中和抗体価について（15才以下）

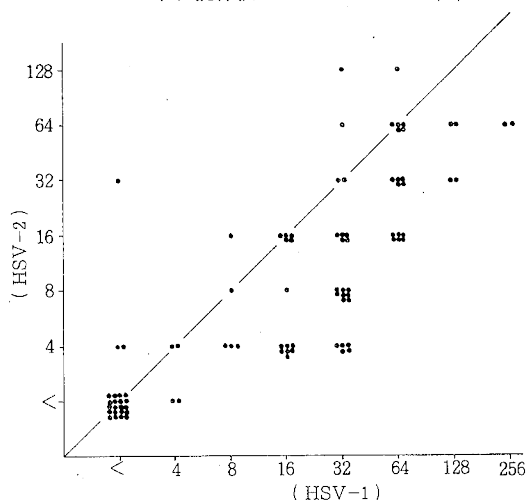


図4 個々のHSV-1とHSV-2に対する中和抗体価について（25才以上）

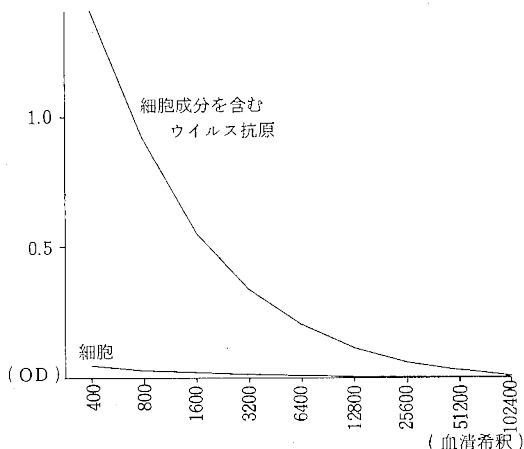


図5 抗原中の細胞成分の検討（HSV-1）

を得た。

② HSV 抗原の濃度の検討

濃度決定のためにHSV 抗原を、X 50, X 100, X 200, X 400, X 600, X 800, X 1000 の希釈段階でコーティングし、標準血清のO.Dで比較したのが図6である。抗原濃度が高くなるとO.Dは上昇し、低くなると下降し、この標準曲線とO.Dの範囲からみて作製したELISA 抗原は、HSV-1, HSV-2ともにX 400倍希釈が適当と考える。

③ ペルオキシダーゼ標識抗体と基質濃度の検討

Box titration によって、各条件、各濃度の至適範囲の検討をおこなったが併せて、ペルオキシダーゼ標識抗体 (P 標識)、基質についても条件の検討をおこないP 標識は、濃度が上昇すればODも高くなり、標準曲線の立ち上がりが見られ、また基質についても同様であった。今回は至適濃度は、P 標識× 5,000 倍、基質は 0.05% で実験に供した。

④ ELISA 値の計算について

ELISA 値の数値を小さくすることと標準血清希釈を少くすることから標準血清 (中和抗体価×64もしくは×128倍患者血清5人混合) のO.Dを1.0として、比例計算で、検査血清のO.Dを標準血清のO.Dを割ったものをELISA 値として表わすこととした。

このことは、適当希釈倍数× 800 の標準血清と検査血清× 800 倍の二点でもってELISA 値を測定することとした。

5. 中和抗体価とELISA 値の相関について

X 軸に中和抗体価、Y 軸にELISA 値をとり、HSV-1 についてプロットしたのが図7でXとYの関係は、 $Y = 0.5486 + 0.0045 X$ 、で0.85 (1%危険率) の相関がみられた。

HSV-2 についてプロットしたのが図8でXとYとの関係は、 $Y = 0.4256 + 0.0077 X$ 、で0.8876 (1%危険率) の相関がみられた。

IV 考察およびまとめ

HSV-1 型とHSV-2 型の中和抗体価の測定は、両型間の交差現象があるが、今回はそれぞれの型を抗原としそれに対する抗体を検出したにとどまった。

県下における状況は、林らの報告している1才から20才で70~80%が中和抗体陰性であり、40才以上では大部分の人が抗体を保有していると同じ結果で、また高い抗体価は高齢者に多いということは、反対に県下では10才以下でHSV-1 型抗原に対する中和抗体価の高いものがみられた。

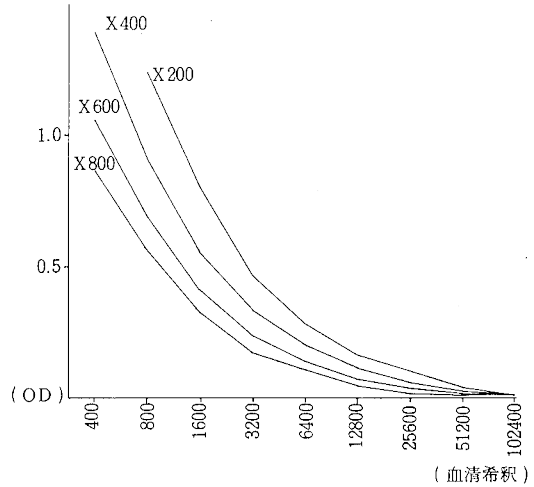


図6 抗原濃度の検討 (HSV-1)

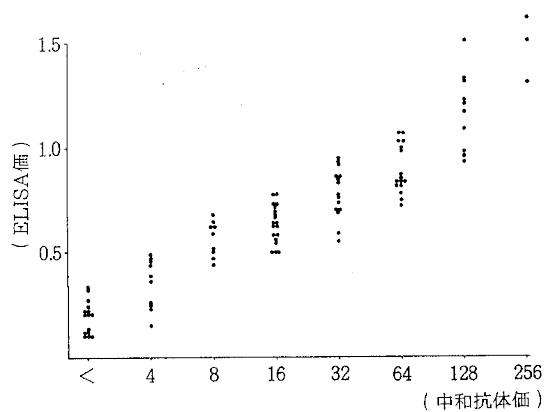


図7 HSV-1 型の中和抗体価とELISA 値の相関について

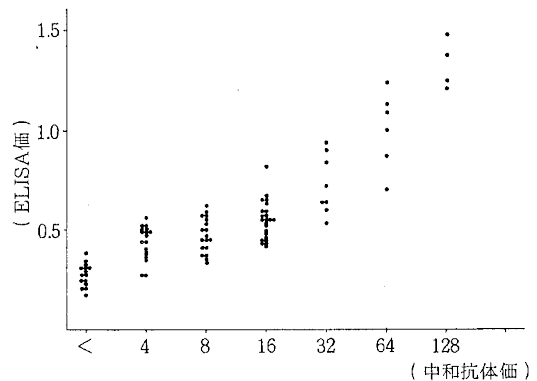


図8 HSV-2 型の中和抗体価とELISA 値の相関について

1型と2型に分けて検討した Rawls<sup>4)</sup>の成績では1型については、0~4才で17%、5~8才で45%と年齢とともに上昇し、26才以上で100%となっている。また2型については、12才以下の小児期の抗体保有者はなく、12才以上で年齢とともに増加している。また、補体要求性中和抗体価で1型と2型の区分をして検討した多田<sup>5)</sup>らの報告によると17才から42才までの年齢層ではあるが、1型陽性率は岩手県67.9%、沖縄県95.9%、2型では岩手県1.5%、沖縄14.9%であり、子宮経癌患者において2型に対する抗体が有意に高いということで県下での2型感染と考えられる抗体を検討してみた。

2型による感染と考えられるケースは少なく大部分は1型との交差による抗体上昇と考えられ、25才以上の高齢者層と15才以下の低年齢者層に区分してみると、15才以下では、1例のみが1型抗体価より高く、ほとんど全てがそれ以下であった。また25才以上については、7例(7.7%)についてみられ、このことから、2型感染は低年齢層に少なく、年齢上昇とともに感染することが考えられる。

また妊娠年齢層では、林<sup>3)</sup>らの調査では陰性率が宮崎県31.5%、福岡37.1%(年齢19才~38才)で同年令比較ではないが県下は、20~25才66.7%、25才以上で20%と同様に比較はできないが、ほぼ同傾向と考える。

ELISAは、微量の抗体、ウイルス抗原が測定できることで、種々のウイルスについて検討され実施されている。またキット化された市販品もある。しかし、各機関の検査方法の統一という点からは、多くの問題がありそれぞれのところで大きな差異があるのが現況である。

今回、方法は、五十嵐<sup>2)</sup>、南嶋<sup>6)</sup>の方法に準拠しBox-titrationによる抗原濃度、P標識、基質については、それぞれ1型2型ともにX 400、X 5000、0.05%が最適となった。

ここで、ウイルス抗原に含まれる宿主細胞成分の検討をしたが、南嶋<sup>7)</sup>らはウイルス抗原作製の場合と同数の細胞から調整した細胞抗原の蛋白量にかなりの差がみられ、偽陽性反応の原因となるため、ウイルス抗原力価を定めそれと同じ蛋白量の細胞抗原を用いると報告しているが今回の実験では、細胞抗原のO.Dはウイルス抗原にく

らべ低率であるので除去計算をせずに実験に供した。

また、これらの条件でおこなったELISA価と中和抗体価との相関については、1型では $r = 0.8527 > 0.83$ (1%危険率)で有意水準1%で相関がみとめられ、2型については $r = 0.8876 > 0.3017$ (1%危険率)で相関があった。

このことから中和抗体価の測定では細胞培養から判定までに多くの時間を要するが、ELISAでは短時間で判定できた。

## V 文 献

- 1) Gerard. A.D, Alexandre. G. Christian. N.: Enzyme Immunoassay for Measurement of Antibodies to Herpes Simplex Virus Infection: Comparison with Complement Fixation, Immunofluorescent-Antibody, and Neutralization Techniques.: Journal of clinical Microbiology.: Feb, 114-119, 1980.
- 2) A. Igarashi, K. Bundo, S. Matsuo, Y. Makino Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) on Japanese Encephalitis Virus I. Basic Conditions of the Assay on Human Immunoglobulin: Tropical Medicine: 23 (1) 49-59, 1981.
- 3) 林嘉信, 森良一, 南嶋洋一, 浜田徳二, 立山造道, 菅原弘明, 山本正悟: 妊婦における単純ヘルペスウイルスの血清疫学的研究; マイクロ中和抗体測定法とELISA法による検討, 感染症学雑誌56(2), 118-125 1982.
- 4) Rawls, W. E, Tompkins. W.A.F, Melnick JK: The association of herpes virus type 2 and carcinoma of the uterine cervix, Am. J. Epidemiol. 89, 547, 1969.
- 5) 多田愛子, 平山宗宏, 橋本和予: 単純ヘルペスのマイクロ中和抗体測定法とその疫学への応用, 臨床とウイルス, 9(1), 70-73, 1981.
- 6) 南嶋洋一, 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(4), 28-32, 1980.
- 7) 南嶋洋一, 広瀬美和子, ELISAによるサイトメガロウイルス抗体測定とその問題点, 臨床とウイルス, 9(4), 39-43, 1981.