

Immuno-double-diffusion test による A 型 インフルエンザの血清学的病原診断(第 1 報)

森田盛大* 庄司キク* 鈴木正則*
後藤良一* 近藤田鶴子*

I はじめに

最近、インフルエンザの新しい血清学的検査手法として Single radial immunodiffusion (SRID) テスト¹⁾²⁾³⁾ がルーチン化されようとしているが、我々は、A 型インフルエンザ罹患者のペア血清を用いて、Immuno-double-diffusion (IDD) テストの有用性を検討したので、第 1 報として、報告する。

II 材料と方法

A. 被検血清

1980年2~4月のインフルエンザ流行時に、IDD、補体結合試験(CF)、赤血球凝集抑制試験(HI)およびウイルス分離のいずれかの検査でH₁N₁型又はH₃N₂型のA型インフルエンザ感染と診断された患者57名(H₁N₁型感染44名、H₃N₂型感染13名)から採取したペア血清を被検血清とした。

B. 方法

1. IDD測定方法

プレートはHB抗原検出用の市販プレート(タテ46×ヨコ31×深サ2mm)を利用した。アガロース(半井化学)は窒化ソーダー添加マイナスPBS(pH 7.2)で1%に加熱溶解して用いた。穴(直径3mm)は中心と六角頂点の計7ヶ所にあけ、また、穴と穴の間隔はいずれも4mmとした。使用抗原として、A/福島/103/78(H₁N₁)株を接種した発育鶏卵の漿尿膜から調製した粗CF-S抗原⁴⁾⁵⁾(CF抗原価64倍)を中心穴に約8μl注入した。

被検血清は予めマイクロタイター上で2段階希釈(通常×2~×8、但し、抗体価の高い場合は×32まで再試験)したものを外側の6穴(急性期血清用3穴、回復期血清用3穴として1ペア分)にそれぞれの希釈血清を約8μlずつ注入した。注入後、プレートを湿潤容器に入れて37°C、16~20時間放置してから沈降帯の形成有無を測定した。

2. CFおよびHI測定方法

CFは上述のCF-S抗原、HIはA/USSR/92

/77株とA/山梨/2/77株をHA抗原として、いずれもマイクロタイター法で行なった⁶⁾。

III 成績

まず、IDD抗体価の病日推移をみると、図1の如く、病日の経過とともに概ね上昇していたが、最も高い抗体価は32倍(16-19病日)であった。1病週以内の幾何平均GM)抗体価は1.2倍にすぎないが、2病週以降では約3.8倍に上昇した4.5倍の抗体価を示した。このIDD抗体を比較するため、同じ抗原によって測定したCF-S抗体価の病日推移を測定してみると図2の如く、最高値は16病日の512倍であり、また、1病週以内のGM

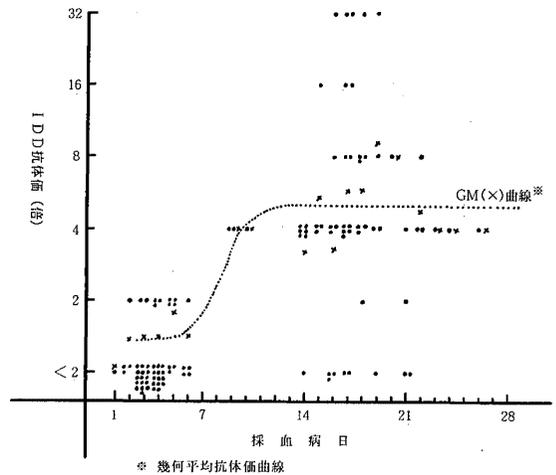


図1 インフルエンザA型IDD抗体価の病日推移

抗体価が3.2倍であるのに対して、2病週以降では11.3倍高い36.2倍に上昇し、ほぼIDD抗体価の上昇傾向と同様の傾向を示した。この両者の抗体価分布を図3の如くプロットしてみると、分布がCF-S抗体側に若干ずれるが、ほぼ相関関係にあると考えられた。

次に、HIとウイルス分離を含めた4法について、患者がインフルエンザであるか否かの病原診断決定率を比

*秋田県衛生科学研究所

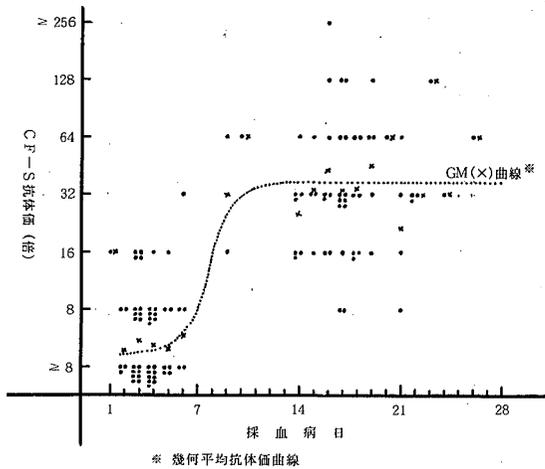


図2 インフルエンザA型CF-S抗体価の病日推移

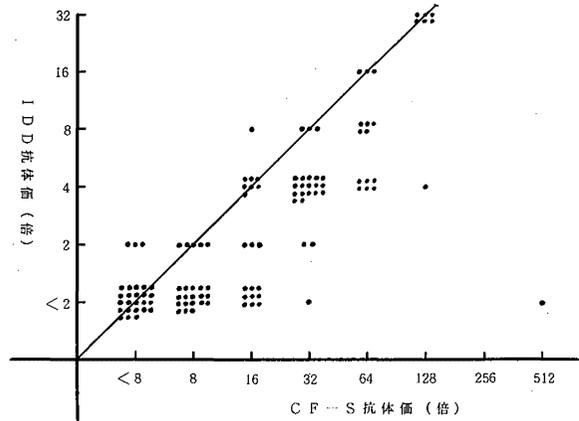


図3 インフルエンザA型IDD抗体価とCF-S抗体価の相関

表1 診断方法別病原診断決定率

病原診断基準		病原診断決定率% (決定患者数/被検患者数)	
IDDで $\geq \times 2$ 上昇		84.2 (48/57)	
CF(S)で上昇	$\geq \times 4$	77.2 (44/57)	
	$\geq \times 2$	91.2 (52/57)	
HIで $\geq \times 4$ 上昇		80.4 (45/56)	
ウイルス分離*		78.8 (41/52)	
IDDで $\geq \times 2$ 上昇 CF(S)で $\geq \times 2$ 上昇	2法ともに上昇	81.8 (45/55)	
	いずれか1法のみ上昇	IDDのみ $\geq \times 2$ 上昇	30.0 (3/10)
		CF(S)のみ $\geq \times 2$ 上昇	70.0 (7/10)
IDDで $\geq \times 2$ 上昇 HIで $\geq \times 4$ 上昇	2法ともに上昇	71.7 (38/53)	
	いずれか1法のみ上昇	IDDのみ $\geq \times 2$ 上昇	60.0 (9/15)
		HIのみ $\geq \times 4$ 上昇	40.0 (6/15)
CF(S)で $\geq \times 2$ 上昇 HIで $\geq \times 4$ 上昇	2法ともに上昇	82.7 (43/52)	
	いずれか1法のみ上昇	CF(S)のみ $\geq \times 2$ 上昇	88.9 (8/9)
		HIのみ $\geq \times 4$ 上昇	11.1 (1/9)

*発育鶏卵, MDCK細胞, MK細胞使用

較した結果、表1の成績が得られた。すなわち、単純に4法を比較すると、IDD、HI、分離、CFの順に診断率が高かったが、CFの場合、当所で疑陽性の判定をしている2倍上昇を加算すると、CFが91.2%で最も高率であった。いずれにせよ、4法はそれぞれ70-80%以上の診断率を示したわけであるが、それでは、ルーチンの血清検査として2法実施する場合、いずれの組み合わせの一致率がよいのかをみてみると、CF-HI系が最もよかった。しかし、CFの2倍上昇の疑陽性例を除去すると、最も低い69.2% (52例中36例)となり、IDD-HI系よりも低率となった。なお、IDD-CF系の不一致欄でCFでのみ上昇した7例中5例、また、IDD-HI系の不一致欄でHIでのみ上昇した6例中4例はいずれもH₃N₂型罹患患者であった。

VI 考 察

我々はインフルエンザ血清検査方法としてCFの有用性を1973年のB型流行⁴⁾以来認めてきたが、一般には本法はあまり活用されていないむきがある。その大きな理由は、やはりCF自体の複雑な操作(手法)が面倒である——我々は必ずしもそう思わないが⁴⁾——と考えられているからであろう。一方、Schildたち¹⁾によってSRID法が開発されて以来、血清学的検査手法の方向が急速にSRIDに向いつつあり、また一方では、微量抗体検出法として、インフルエンザウイルス感作血球と補体と寒天に入れて測定するSingle radial hemolysis反応¹⁾が開発され、検査手法がより簡便且つ鋭敏な手法へと進みつつある。これに対して、IDDはこれまで主としてウイルス株の抗原分析や抗体分析に用いられ、血清学的検査手法としては、あくまで定性的なものとして理解され、殆んど用いられてこなかった。

このようなことから、我々は、定量性のある検査方法として、IDDの手法を検討することとしたのである。その第1歩として、CF-S——従って、型特異的であるが、株特異的でない——の代用としてのIDD法の活用を検討してみたが、得られた成績はHIの診断率を上廻るものであった。しかも、血清希釈はマイクタイト

一上ですので、操作全体はCFよりかなり容易となり、且つ、用いる粗CF-S抗原は、精製ウイルスを用いるのと異なり、どこでも容易に調製し得るのである。又、プレートを1度に多数作成し、4℃に保存すれば、かなり長期間保存でき、使用に便利である。

我々は、このIDD法をB型診断にも一部適用してはば同じ結果を得ているが、今回報告したCFとの不一致やIDD抗体の産生されない例(9例)の起因などを含めて、使用抗原の種類と最適濃度、ゲルの種類と濃度、緩衝液の種類、HI抗体やNI抗体の測定への活用など、より鋭敏な、定量的に再現性のあるIDD手法を今後検討していく考えである。

V 結 論

A型インフルエンザの血清学的病原診断方法として、Immuno-double-diffusion (IDD) 試験を44例のH₁H₁型罹患者と13例のH₃N₂型罹患者のペア血清について実施した結果84.2%の診断率を得た。

文 献

- 1) Schild, G. C., et al: Immunity to influenza, *Develop. biol. Standard*, 28, 253-272 (1975)
- 2) Kilbourne, E. D.: The influenza viruses and influenza, Academic Press, New York and London, *Influenza virus characterization and diagnostic serology* (Schild, G. C., et al), 315-372 (1975)
- 3) 石田名香雄たち: インフルエンザの新しい検査法, *臨床とウイルス*, 3 (4), 13-20 (1975)
- 4) 森田盛大たち: B/73型インフルエンザの流行と血清学的検査—特にCF法の有用性について, *秋田県衛生科学研究所報*, 18, 39-42 (1974)
- 5) 国立予防衛生研究所学会編: ウイルス実験学各論, 丸善, *インフルエンザウイルス*, 31-53 (1967)
- 6) 甲野礼作たち: *臨床ウイルス学手技篇*, 第1版, 講談社サイエンティフィック, *血清学的検査法* (森田盛大), 57-76 (1978)