

IV 報 文

ヒトロタウイルス免疫抗体を用いたELISA法 によるロタウイルスの検出について

佐藤 宏 康* 原田 誠三郎* 安部 真理子*
園子 隆 信* 浅野 善文* 森田 盛大*

I 緒 言

ヒトロタウイルスの検出法には電顕法, R-PHA法, Latex法, 電気泳動法, ELISA法などが用いられている。現在市販されているELISA法のキットはサルロタウイルスSA-11の免疫抗体を使用しているため, ヒトロタウイルスの検出率は電顕法¹⁾や, 電気泳動法, Latex法²⁾より劣るといわれている。

われわれは, ヒトロタウイルス由来株から作製した免疫抗体, ペルオキシダーゼ, イムノプレートを用いたELISAの系をSandwich法で行ない, R-PHA法(Rotacell)と比較検討したので, その成績について報告する。

II 材料及び方法

A 材料

1 糞便

昭和59年4月から昭和60年3月末までの間に秋田県内の定点観測病院で採取された下痢症患者糞便138検体。

2 MA-104細胞

使用細胞は予研, 腸内ウイルス部より分与されたMA-104細胞で, 培養法はSatoら³⁾の方法に準じて行なった。

3. ヒトロタウイルス株

56年3月大館市内の下痢症患者(生後2カ月)の糞便から著者ら⁴⁾が分離した15491株, 本ウイルスは抗NC DV血清, 抗SA-11血清との交差反応からロタウイルスであることは確認されているが, 血清型は不明である。

4. 免疫抗原及び免疫血清

15491株の精製法は図1に示した。精製抗原を Freund の Complete adjuvant と共にウサギの筋肉内及び皮内に注射し, 1カ月後静注2mlを行ない, 1週間後に全採血した。使用時まで-20°Cに保存した。R-PHA I 抗体価で免疫前10倍未満から免疫後は2,560倍であった。

MA-104細胞にて培養した15491株
Roller Bottleにて培養

—凍結融解1回

—8% PEG, 0.5 M NaCl

4 C, overnight

15,000 rpm, 30min.

Sediment

—PBS(-)にsuspend

—Difron 処理2回

—40,000 rpm, 90min.
(100,000 G)

Sediment

—PBS(-) 1 ml

—Sonication

—10~50% Sucrose cushion
25,000 rpm, 90min.

fraction No 2

—PBS(-)にsuspend

100,000 G, 90min.

Sediment

—PBS(-) 2.5 mlにsuspend

Immuno-Ag(>10^{8.0}/0.1 ml)

図1 免疫抗原の精製

5 抗ヒトロタウサギ IgG

1/3飽和 (NH₄)₂SO₄ 塩析を3回くり返したのち, DEAE-Cellulose column chromatography を行ない, 吸光度 280 nm でのピーク部分を凍結乾燥にて濃縮した。得られた IgG はマイクロオクトロニー法で精製抗原とは一本の沈降線を形成するが, 正常抗原 (MA-104 細胞) とは反応しない。

* 秋田県衛生科学研究所

6 イムノプレート

Nunc-Immuno Plate II, Limbro EIA Micro-titration plate, 住友ベークライトH型, S型及びポリスチレンマイクロプレートを用いて予備試験を実施した。本試験には上記のH型を使用した。

7 Autoreader 及び Washer

大日本製薬K・K, Titertek Multiscan MC 及び Titertek Microplate Washer 102を用いた。

B 方法

1 糞便抽出法

0.067 MのPhosphate buffer (pH 7.1) にて糞便を5%に抽出, Difron S-3 (ダイキン工業) にて1回処理後の上清をグルタルアルデヒドで固定の羊赤血球にて吸収した遠心上清を R-PHA 及び ELISA 用の検体

とした。

2 R-PHA 法

日水のRota cellキットを用いた。糞便処理は上記によったが, 希釈液, 感作赤血球は処方に従い使用した。

3 蛋白の定量

Lowry法⁶⁾により行なった。蛋白量はBovine Serum Albumin 換算量として示した。

4 ペルオキシダーゼ結合方法

シグマ社のハウスラディッシュペルオキシダーゼVI型と抗ヒトロタウサギIgGとの結合はNakane⁷⁾の方法により行なった。

5 ペルオキシダーゼ結合抗ヒトロタウサギIgGの力価測定

住友ベークライトH型Plate

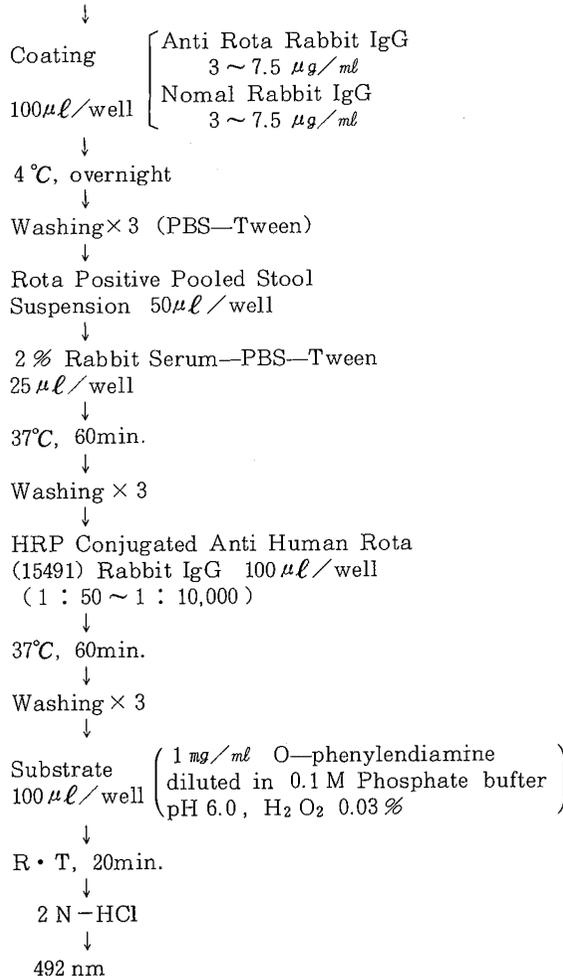


図2 IgG 結合ペルオキシダーゼの力価測定

図2に示した。Coatingには炭酸ナトリウム緩衝液 pH 9.6を用いた。イムノプレートにCoatingする蛋白量は抗ヒトロタウサギIgGと正常ウサギIgGと同じに調整した。すなわち、3~7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で予備実験を行なった。抗原はヒトロタウイルス陽性の糞便抽出液をプールして使用した。洗浄液はPBSにTween20を0.05%に添加して用いた。波長は492 nmにて測定した。

6 Sandwich法によるヒトロタウイルスの検出法

図2に準じた。すなわち、イムノプレートにCoatingする蛋白量は抗ヒトロタウサギIgG、正常ウサギIgGともに、予備実験より多い10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした。また、ペルオキシダーゼ結合抗ヒトロタウサギIgGは400倍希釈にて使用した。各糞便抽出液は正常ウサギIgGと抗ヒトロタウサギIgGをCoatingしたwellに各々2穴、50 μl ずつ分注した。吸光度は抗ヒトロタウサギIgGの平均吸光度から、正常ウサギIgGの平均吸光度との差として表わした。

III 成績

1 ペルオキシダーゼ結合抗ヒトロタウサギIgGの力価測定成績

結果は図3に示した。すなわち、吸光度1.0以上の酵素

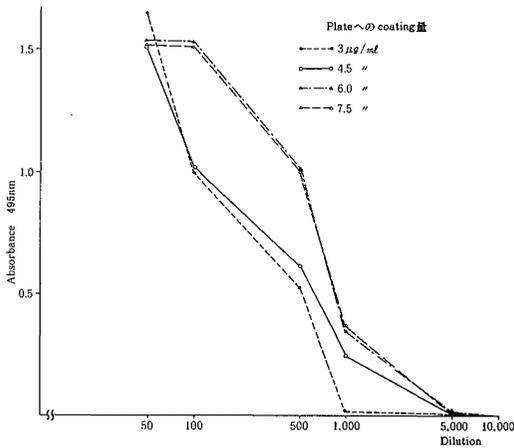


図3 IgG結合ペルオキシダーゼの吸光度曲線

活性を表現させるためには、イムノプレートにcoatingする蛋白量が多くなれば、ペルオキシダーゼ結合抗ヒトロタウサギIgGは高希釈で使用できることを示している。6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の蛋白量があればよいと推定されたが、ほぼ2倍量相当10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の蛋白量を含む液の100 μl 、すなわち1.0 $\mu\text{g}/\text{well}$ を本試験におけるcoating量とした。ペルオキシダーゼ結合抗ヒトロタウサギIgGの吸光度が1.0以上を示す濃度1:400を使用濃度と決定した。

2 Sandwich法とR-PHA法による測定成績

59年度に採取した糞便138検体に対する測定成績を図4に示した。陽性限界を吸光度0.1以上として判定する

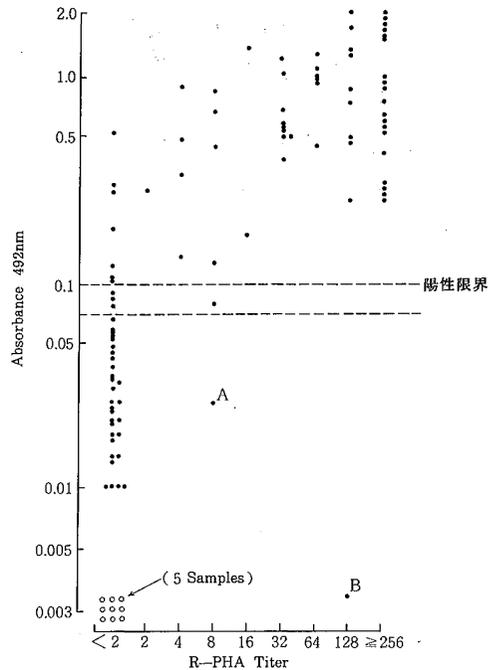


図4 Sandwich法とR-PHA法の比較

と、138検体中57検体(41.3%)がロタウイルス陽性であった。一方、R-PHAでの陽性限界を規定に従いがい8倍以上とすると、48検体(34.8%)が陽性であった。(表1)。一致率は89.1%であった。また、図4中A、

表1 Sandwich法とR-PHA法の比較

R-PHA	Sandwich法		計 (%)
	+	-	
+	45	3	48 (34.8)
-	12	78	90 (65.2)
計 (%)	57 (41.3)	81 (58.7)	138 (100)

Bとマークした検体について、アルカリホスファターゼを用いたELISAの系(2抗体法)で測定したところ、Aは陽性、Bは陰性であった。すなわちR-PHAで高い値を示すにもかかわらずELISA法で検出できない検体が1例のみ認められた。また、R-PHA法で2または4倍を示した5検体はすべてELISA法で陽性と判定さ

れた。

IV 考 察

イムノプレートに coating する蛋白量はプレートの種類により異なるので予備実験が必要である。Nunc, Limbro, 住友ベークライトの H 型, S 型, ポリスチレン製の 5 種類についてウサギ IgG の吸着実験を行なった⁸⁾。その結果 IgG の吸着は中程度であるが、価格の面で入手しやすいベークライトの H 型を使用することとした。

H 型プレートを使用した場合、ペルオキシダーゼ結合抗ヒトロタウサギ IgG の吸光度が 1.0 以上を示すのは、蛋白量 3~4.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の coating では 100 倍、6~7.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の coating 量では 500 倍であった。そこで本試験での coating 量は 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、またペルオキシダーゼ結合抗ヒトロタウサギ IgG は 400 倍にて使用した。しかし、ペルオキシダーゼ結合 IgG の使用希釈 400 倍は高いものではなかった。Nakane⁷⁾の方法では存在する IgG の 99% がペルオキシダーゼに結合するといわれているので、IgG 結合が十分でなかった可能性が考えられた。

陽性限界を cut off value で示す方法もあり、この場合陰性コントロールから吸光度 0.07 と計算された。最近、厚生省レファレンスシステム研究班ウイルス性下痢症検査法⁹⁾によると吸光度 0.1 以上で、かつ対照との吸光度が 2 倍以上を陽性としている。また、Yolken¹⁰⁾はアルカリホスファターゼを用いた Sandwich 法では吸光度 0.2 以下では凝陽性反応の可能性があるとしている。われわれは対照との吸光度の差が 0.07~0.1 未満を凝陽性反応領域、0.07 未満を陰性領域、0.1 以上を陽性領域とした。ELISA の吸光度 0.1 以上、R-PHA 8 倍以上を陽性として判定すると、一致率 89.1% で、勝島ら¹⁾の ELISA と電顕法の一一致率 81.2% より高い。ELISA 法での検出率 41.3% R-PHA 法での検出率 34.8% と前者が 6.5% 高かった。これはペルオキシダーゼを用いた ELISA 法では特異性が高く、感度が優れていること、ヒト由来ロタウイルス株を使用したことによるとと思われる。しかし、図 4, A, B に示したように R-PHA 法で陽性でもペルオキシダーゼの系で陰性を示す検体が認められた。A はアルカリホスファターゼを用いた ELISA の系で陽性を示すことから、糞便抽出液中に、測定中の洗浄操作では除去されないような、ペルオキシダーゼ活性阻害物質の存在が推定された。一方 B はアルカリホスファターゼの ELISA 系でも陰性を示した。B はウシロタウイルス NC DV に極めて近似の抗原構造を有し、ヒトロタウイルスの抗体とは反応困難なウイルスなのであろうか。あるいは、ヒトロタウイルス 15491 株とは反応しない血清型の存在を示唆しているのではあろうか。それとも、ペルオキシダー

ゼ、アルカリホスファターゼのいずれの酵素活性をも失活させるような物質が混在していたのであろうか。いずれにしても B については十分な説明を与えるには至らなかった。

サルロタウイルス SA-11 の免疫抗体を用いた ELISA 法ではウシロタウイルス NC DV を用いた Latex 凝集法²⁾や直接のウイルス分離法²⁾より検出率は劣るといわれているが、ヒト由来ロタウイルス免疫抗体を用いた ELISA 法では R-PHA 法より検出率が高かった。いずれにしても検出に万全を期すとするれば R-PHA 法と ELISA 法、Latex 法と ELISA 法など 2 法を併用することが望ましいと考えられる。今後 Latex 法と併用し自家製 ELISA の有用性について検討していきたい。

V 結 論

県内で分離されたヒト由来ロタウイルスの免疫抗体を用いた ELISA を sandwich 法で行ない、R-PHA 法と比較検討した。一致率は 89.1%、検出率は ELISA 法が 6.5% 高かった。

文 献

- 1) 勝島矩子たち：糞便中ヒトロタウイルス検出法の比較，臨床とウイルス，11，(3)，69-73 (1983)
- 2) 田島剛：各種の方法によるヒトロタウイルスの検出成績，臨床とウイルス，12(3)，322-324 (1984)
- 3) Sato K., et al : Isolation of Human Rotavirus in cell cultures, Arch. of Virology, 69, 155-160 (1981)
- 4) 佐藤宏康たち：下痢症に関するウイルス学的研究 (第 5 報)，秋田県衛生科学研究所報，26, 67-71 (1982)
- 5) 渡辺慶一たち：酵素抗体法，学際企画，標識抗体の作り方，21-24 (1980)
- 6) Lowry, O. H., et al : Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
- 7) Nakane, P. K : Conjugation of Peroxidase with Immunglobulins, J. Histochem. Cytochem. 18, 134-136 (1970)
- 8) 齊藤志保子たち：未発表データ，
- 9) 井上栄：ウイルス性下痢症検査法，厚生省，レファレンスシステム研究班，(1985, 3)
- 10) Yolken, R. H., et al : Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Detection of Human Reovirus-like Agent of Infantile, Lancet, August 6, 263-266 (1977)