

## ELISA法を用いたCox.A群ウイルスの同定

佐藤宏康\* 安部真理子\* 原田誠三郎\*  
森田盛大\*

### I 緒言

Coxsackie (Cox.) A群ウイルスは組織培養細胞で容易に分離される型とそうでない型がある。

前者はCox.A-9, 16型などであり, 後者はCox.A-1, 2, 5, 6型などである。しかし, RD細胞の使用によりCox.A-1, 19型を除く多くの型はトリプシン添加<sup>1)</sup>などによって馴化増殖可能となった。その結果血清疫学的調査が容易になり, Cox.A群ウイルスの侵襲像がかなり解明された。<sup>2), 3), 4)</sup>しかし, ウイルス分離の場合は現在でも哺乳マウス(SM)による分離率が最も高いといわれている。<sup>5)</sup> Cox.A群ウイルスの分離同定をSMを用いず, ELISA法で行う試みはYolken<sup>6)</sup>によって行われた。そして, いくつかの交差反応が存在するが, 有用な方法であることを報告している。著者らもSMを用いないCox.A群ウイルスの分離同定システムの開発を目的として, まず第1段階に, Cox.A-10型をモデルにSMで分離されたCox.A-10型ウイルスをELISA法で同定できるか否かを, サンドイッチ(SW)ELISA法と二抗体(DA)ELISA法で比較検討した結果, 両法とも特異性は高いが, DA-ELISA法の方がより有用であると考えられたので, その成績について報告する。

### II 材料及び方法

#### A 材料

##### 1 使用ウイルス株

予研, 腸内ウイルス部より分与を受けたCox.A-10型, Kowalik株を使用した。

##### 2 組織培養細胞

青森衛研より分与されたL-132細胞を用いた。

##### 3 哺乳マウス

dd系のマウスを当所で交配し, 生後72時間以内に使用した。

#### 4 被検ウイルス分離株

昭和56年から61年までの間に秋田県内で分離され, SMを用いた中和試験により同定されたCox.A-2型15株, Cox.A-4型14株, Cox.A-5型11株, Cox.A-6型6株, Cox.A-10型24株の合計70株で, いずれも初代分離株である。ELISA法の比較検討にもこの株の一部を使用した。

### B 方法

#### 1 SMによる免疫抗原の調製

Kowalik株をSMの皮下に接種, 発症後, 頭部, 四肢, 尾, 表皮, 内臓を除去したのちホモジナイザーにて20%乳剤とした。以下図1に従ってウイルス抗原を部分精製した後, 10-50%蔗糖濃度勾配遠心にかけて9本の分画をとり, 最大の感染価を示すFraction ( $>10^{8.5}$  LD<sub>50</sub>/0.04ml)を免疫抗原とした。

#### 2 正常SM抗原の調製

ウイルスを感染させないSMを前述の如く処理して20%乳剤としたのち, 図2に従い, 免疫抗原及びELISA用正常SM抗原を調製した。

#### 3 L-132細胞による免疫抗原及び正常L-132抗原の調製

L-132細胞の培養は10%の割合に牛血清を含むMEM培地を用い, ローラーボトルにて培養した。細胞がmonolayerを形成したのち, 重曹と抗生物質を含むMEM培地で洗浄後, L-132細胞に馴化継代したKowalik株を接種, 十分なCPEが出現した時点でウイルス液を回収し, 図3に示した方法で濃縮精製を行なった。免疫抗原はFraction 2 ( $>10^{8.5}$  TCID<sub>50</sub>/0.1ml)を用いた。また, 免疫用正常L-132抗原及びELISA用抗原はL-132細胞をPBSで洗浄後, 凍結融解と超音波処理をし, 3,000 rpm, 20分間遠心した上清を用いた。

#### 4 免疫方法及びIgGの調製

得られた精製抗原をマイナスPBSで透析後, Freundのcomplete adjuvantと等量混合し, ウサギまたは

\* 秋田県衛生科学研究所

モルモットの皮下および筋肉内に注射した。30日後ウサギは静脈内、モルモットは腹腔内に追加免疫を行ない、1週間後全採血を行ない抗血清を得た。各抗血清を1/2飽和硫酸アンモニウム塩析を3回行ない、図4によりIgGを抽出した。

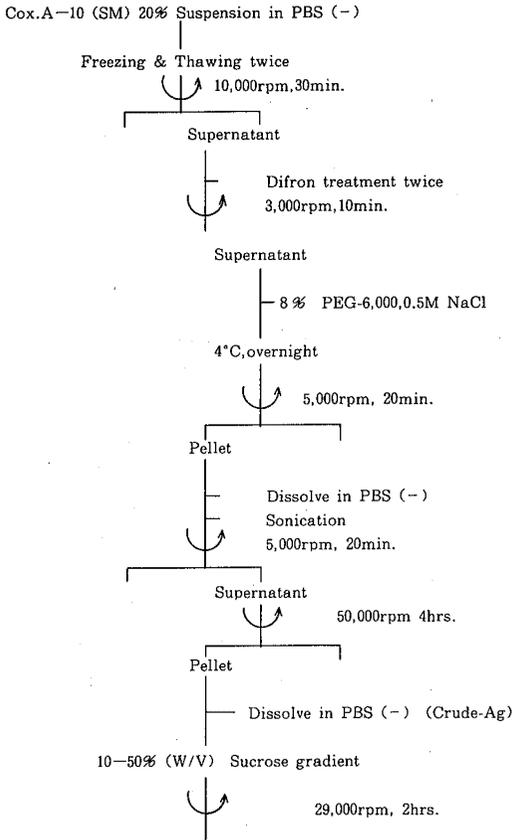


図1 SMを用いた免疫抗原の調製

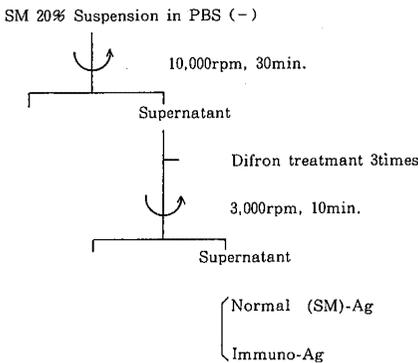


図2 正常抗原の調製

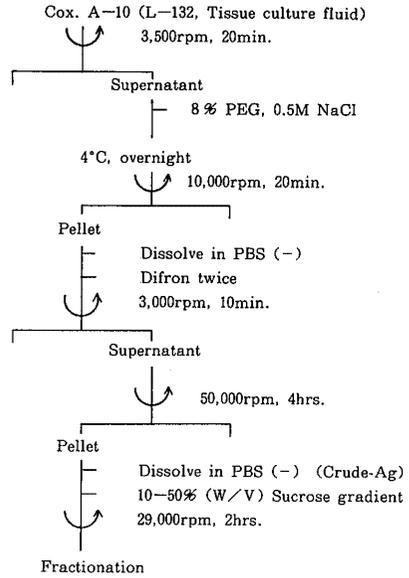


図3 L-132細胞を用いた免疫抗原の調製

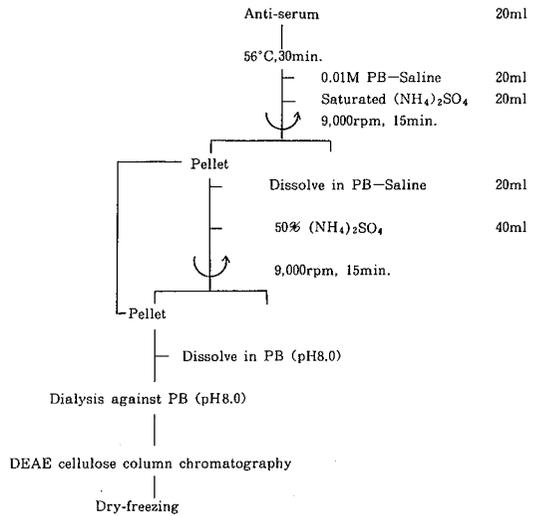


図4 IgGの抽出法

### 5 蛋白質量の測定

蛋白質量はLowry法<sup>7)</sup>で測定し、牛血清アルブミン換算量として示した。

### 6 ゲル内沈降反応

1% Special noble agar を含むペロナール緩衝液 (pH8.6,  $\mu=0.025$ ) を用いたマイクロオクタロニ法<sup>8)</sup>によった。

### 7 分離ウイルス株の処理方法

SMでの分離株を抗生物質を添加したLE培地を用いて10%乳剤とした後、3,000rpm,10分間遠心した上清をマイナスPBSで4倍に希釈,さらに等量のDifron S3にて1回処理した遠心上清を検体とした。

### 8 SW-ELISA法

著者らがRotavirusの検出に用いた方法<sup>9)</sup>で行なった。すなわち,L-132細胞の系で作製した抗Cox.A-10ウサギIgG(L-132)及び正常L-132抗原ウサギIgGの各々を100 $\mu$ l(10 $\mu$ g/ml)ずつ住友ベークライト社のMS-3596Fイムノプレートに添加した。抗Cox.A-10ウサギIgGとHorseradish peroxidase(HRPO)の結合はNakaneの方法<sup>10)</sup>により行なった。

### 9 DA-ELISA法

DA-ELISA法は図5の如く行なった。すなわち,一次抗体としてSMの系で作製した各IgG100 $\mu$ l(10 $\mu$ g/ml)を前記のイムノプレートに4 $^{\circ}$ Cで一晩coating

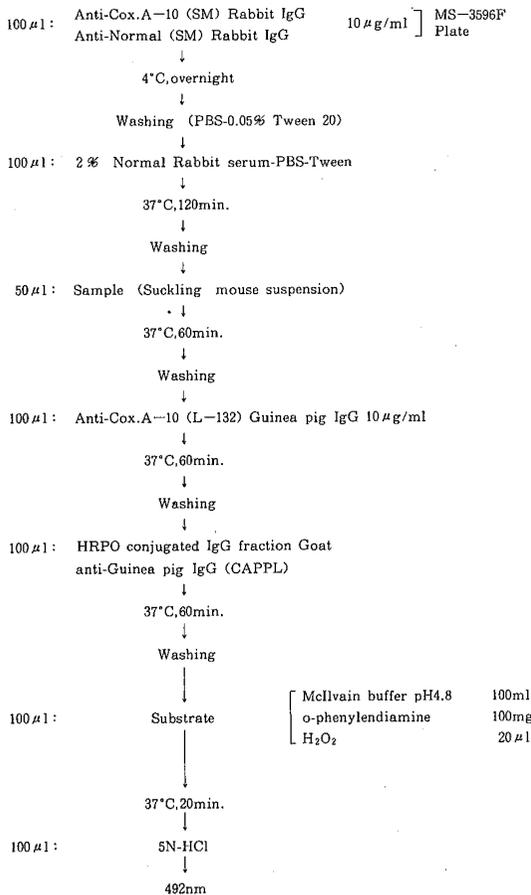


図5 DA-ELISA法

した。翌日0.05%にTween-20を含むPBSで, Titer-tek Microplate Washer 102を用いて5回洗浄した。次いで2%の割合に正常ウサギ血清を含むPBS-Tween液と37 $^{\circ}$ Cで120分間反応させた。5回洗浄後, 50 $\mu$ lの検体を加えて37 $^{\circ}$ Cで60分間反応させた。二次抗体として抗Cox.A-10モルモットIgG(L-132)を添加して反応させた後, 洗浄し, HRPO結合抗モルモットIgGヤギ血清と反応させ, Titer-tek Multiscan MCを用いて492nmの波長で吸光度を測定した。

### 10 判定法

両方法とも抗Cox.A-10ウサギIgGの吸光度から抗正常抗原ウサギIgGの吸光度を差し引いた値で表示した。値が負を示す場合は0.0として表示した。

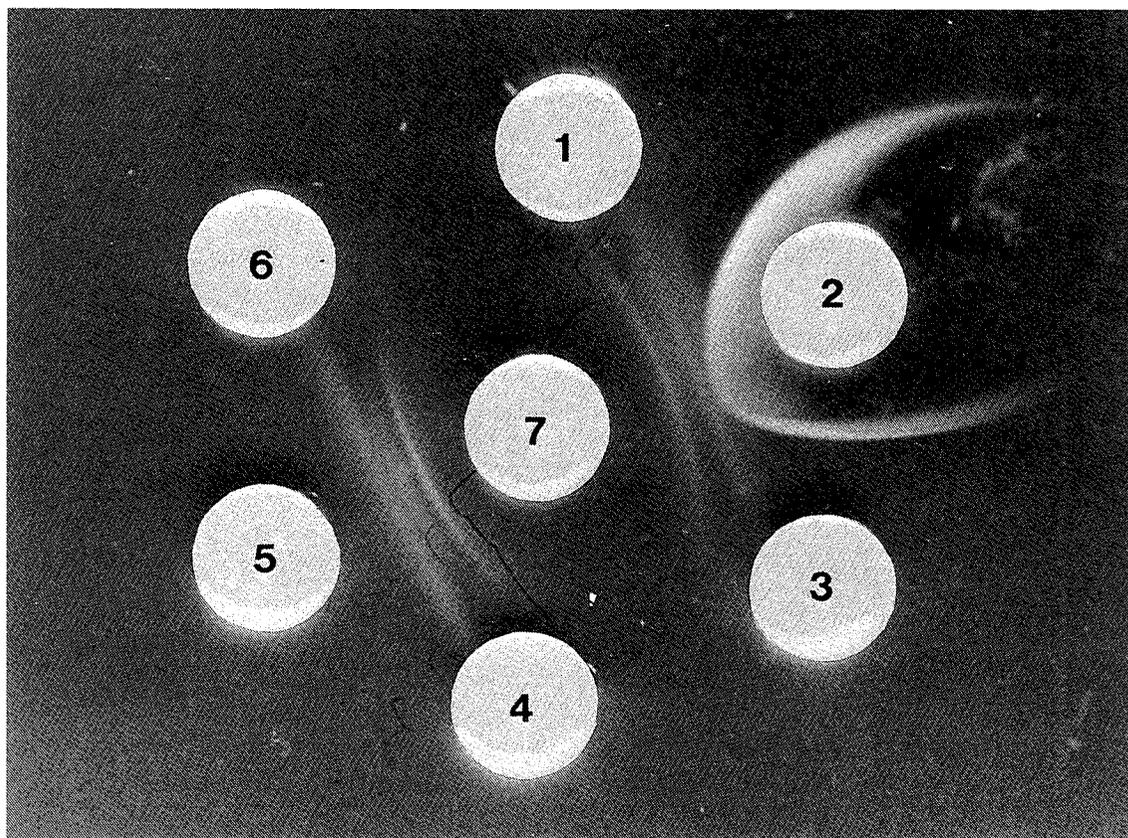
## III 成績

### A 抗血清の中和抗体価及びIgGの反応態度

精製抗原を免疫して得られた抗血清の中和抗体価は表1に示したとおりであった。すなわち, SMで測定した場合は組織培養系で測定した場合より20倍又はそれ以上高い価であった。これらの抗血清から抽出したIgGの反応を図6に示した。1, 4にはSM由来の抗原を免疫して得られた抗Cox.A-10(SM)ウサギIgG, 3, 6はL-132細胞由来の抗原を免疫して得られた抗Cox.A-10(L-132)モルモットIgGを入れた。2はCox.A-10(SM)粗抗原, 5は正常SM抗原を, また, 中央7には抗正常SM抗原ウサギIgGを入れた。二種類の抗Cox.A-10 IgGは5の正常SM抗原とは反応せず, 2のCox.A-10(SM)粗抗原とのみ反応した。図6には示さなかったが, 抗Cox.A-10(L-132)ウサギIgGも同様の性状であった。

表1 Cox. A-10に対する中和抗体価

Anti serum	Neutralization test	
	by S M	by tissue culture
Anti Cox.A-10 (SM) Rabbit serum	32,000	1,280
Anti Cox.A-10 (L-132) Guinea pig serum	8,000	400
Anti Cox.A-10 (L-132) Rabbit serum	>50,000	>2,000



1. Anti-Cox.A-10 (SM) Rabbit IgG
2. Cox.A-10 (SM) crude-Ag
3. Anti-Cox.A-10 (L-132) Guinea pig IgG
4. Anti-Cox.A-10 (SM) Rabbit IgG
5. Normal (SM) -Ag
6. Anti-Cox.A-10 (L-132) Guinea pig IgG
7. Anti-normal (SM) -Ag Rabbit IgG

図6 抗原と精製IgGのゲル内沈降反応

#### B SW-ELISA法とDA-ELISA法の比較検討

各被検ウイルスとHRPO結合抗Cox.A-10(L-132)ウサギIgGについて行なった成績は図7の如くであった。一方、図5に示したDA-ELISA法による成績は図8の如くであった。この方法では市販のHRPO結合モルモットIgGヤギ血清が使用できた。Cox.A-10(SM)粗抗原を指標にしてSW-ELISA法とDA-ELISA法を比較すると、後者は吸光度も高く表現され、直線的な反応が認められたことから、DA-ELISA法によりCox.A-10型ウイルスを同定する

こととした。

#### C DA-ELISA法によるCox.A群ウイルスの同定成績

Cox.A-2型15株、Cox.A-4型14株、Cox.A-5型11株、Cox.A-6型6株、Cox.A-10型24株をDA-ELISA法で測定した成績を図9に示し。Cox.A-2型の場合1株のみが8倍希釈で0.089の吸光度を示したが、0.1以上の吸光度を示したのはCox.A-10の24株のみであり、高い特異性が認められた。

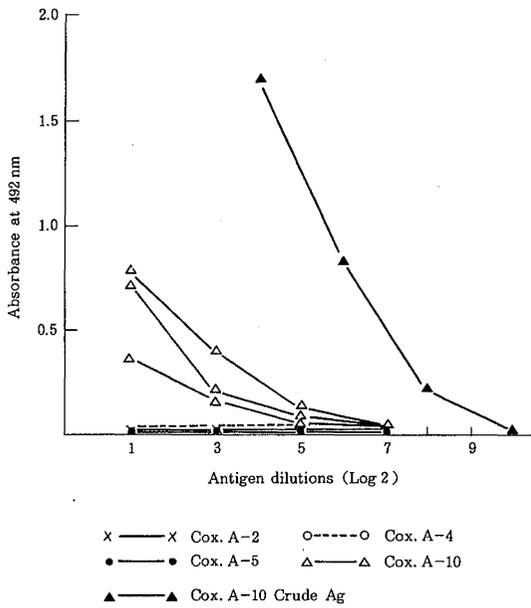


図7 サンドイッチ法による各ウイルスの反応

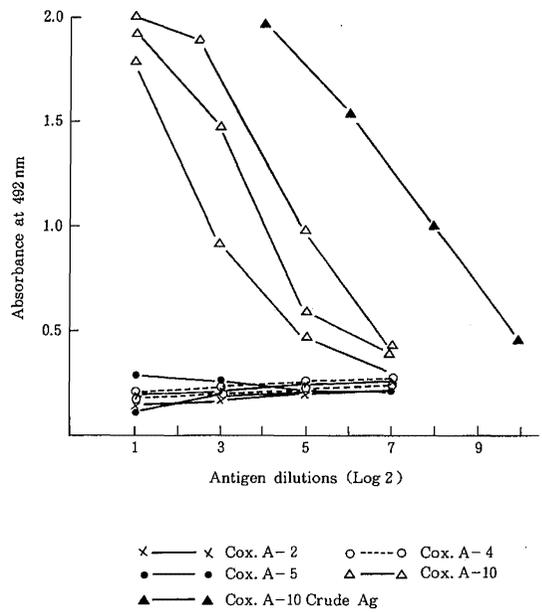


図8 二抗体法による各ウイルスの反応

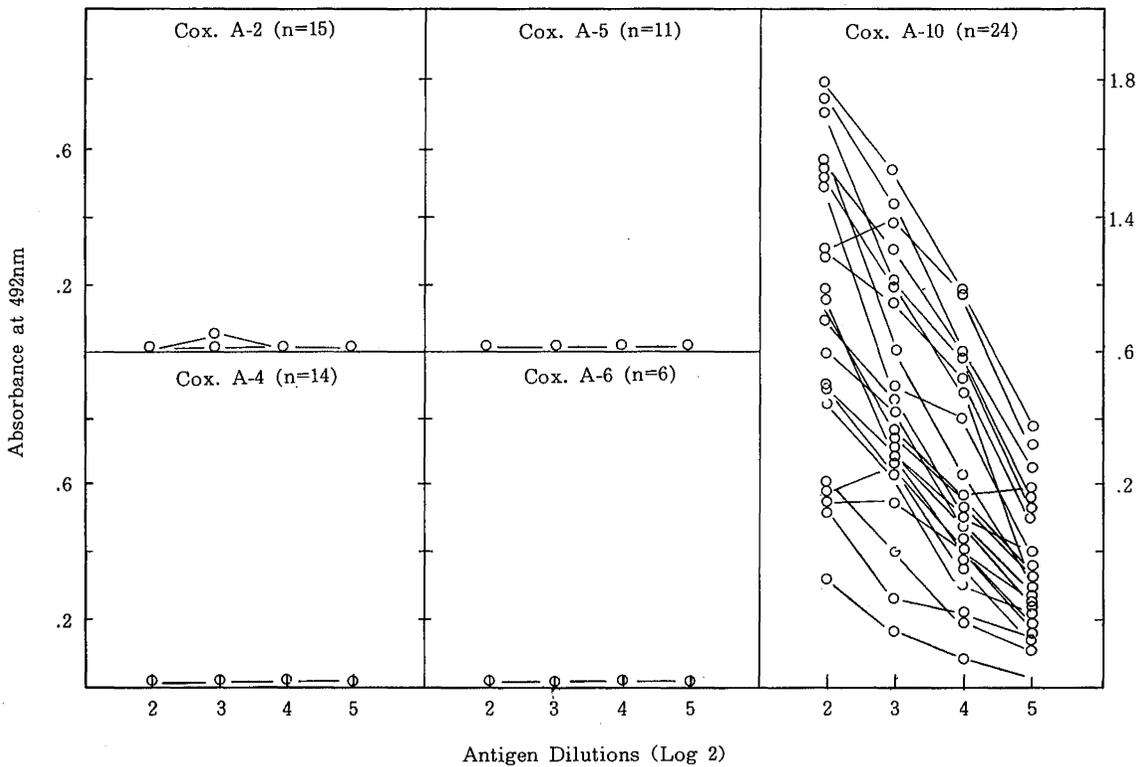


図9 二抗体法によるCox. A群ウイルスの同定

## IV 考 察

昭和51年秋田県で病原微生物定点観測調査を開始して以来,<sup>11)</sup> SMのみで分離されたCox.A群ウイルスの分離総数は60年度までに234株であった。その型はCox.A-2, 4, 5, 6, 10型の5種類が主であり, 上記以外の型はCox.A-3の1株のみで, 全体の0.4%に過ぎなかった。従って, Cox.A-3型を除く5種類, すなわち, Cox.A-2, 4, 5, 6, 10型の分離同定システムを開発すればSMを用いなくても, ヘルパンギーナなどを惹起するCox.A群ウイルスの病原迅速診断が可能であると考えられた。

このようなことから, 第1段階として, 上記5種類のうち, Cox.A-10型をモデルとして, SMで分離されたCox.A-10型ウイルスをELISA法で特異的に同定できるか否かを検討した。本ウイルスを用いたのは過去10年間に2~3年間隔で主流株, 又は副流行株となって侵襲し, 分離株数が多いウイルスであること,<sup>12)</sup> また, L-132細胞とHEA J細胞(当所で樹立したヒト由来細胞)で容易に馴化継代可能であること<sup>13)</sup> の理由からであった。SMで分離されたCox.A群ウイルスの同定は, SMを用いた中和同定試験が一般的で確実であるが, 大変な労力と経費を必要とする。そこで, SMの分離株を抗Cox.A群マウス免疫腹水を用いるIAHA法<sup>13)</sup> やCF試験<sup>14)</sup> による同定法が導入された。CF試験は手軽に行えるが, 反応難のためSM2代継代株でも同定できない株が存在することが報告されている。<sup>15)</sup> これに対して著者らが検討したSW-ELISA法とDA-ELISA法の両法はCox.A-10型ウイルスの初代分離株でも特異的に同定することができた。一方, SW-ELISA法とDA-ELISA法を比較すると, 前者の特異抗体は一種類の動物でよく, 抗体の調製も細胞由来, SM由来のどちらでも可能であるが, SMを用いて分離した株の同定では細胞由来の抗体を用いた方が, SMに由来する非特異反応を少なくすることができると考えられる。最大の欠点は各ウイルス型毎の特異抗体(IgG)とHRPOとを結合させなければならないことである。また, 数種類のIgG-HRPO結合物を同時に取り扱うことは実際問題としてトラブルが生じ易い。一方, DA-ELISA法では, 細胞とSM由来の2種類の抗原に加えて, 相違する動物を免疫して得たIgGが必要である。次に, 洗浄回数と反応時間が多くかかる欠点がある。しかし, 抗ウサギIgGあるいは抗モルモットIgGとのHRPO結合体が市販されているので, 由来の異なる抗原を相違する動物に免疫し, IgGを抽出すればDA-ELISA法は容易である。一次抗体としてSM由来のIgG抗体を使用した<sup>16)</sup> が, この段階ではSM

由来の分離株(SM乳剤)に対して多くの非特異反応が予想される。従って, 二次抗体として用いる抗Cox.A-10(L-123)モルモットIgGは特異性が高く, かつ, 正常SM抗原と反応しないことが前提条件であると考えた。

現在, RD細胞を用いることによって, 1, 19型を除くCox.A群ウイルスは培養可能なので, SMとRD細胞の系で抗原の作製ができる。したがって, 著者らのDA-ELISA法によって, SMで分離されたCox.A群ウイルス, 少なくともCox.A 2, 4, 5, 6, 10型の同定が可能であると考えられた。今後, Cox.A-2, 4, 5, 6の四種類のシステムを作製することができれば, ヘルパンギーナの病原ウイルスの迅速診断に活用できると考えられる。

## V ま と め

SMで分離されたCox.A-10型ウイルスをDA-ELISA法によって特異的に同定できることを報告した。

本論文の要旨は第40回日本細菌学会東北支部総会(青森市, 1986)において発表した。

## 文 献

- 1) 佐藤允武たち: トリプシン添加RD細胞におけるコクサッキーA群ウイルスの増殖, 青森県衛生研究所報, 21, 11-14 (1984)
- 2) 中村忠義たち: A群コクサッキーウイルスの中和抗体保有からみた血清疫学, 群馬県衛生公害研究所年報, 17, 79-84 (1985)
- 3) 栄賢司たち: RD-18S細胞を用いたCoxsackie A群ウイルスの疫学: 第33回日本ウイルス学会総会, 東京 (1985)
- 4) 佐藤允武たち: 青森市におけるコクサッキーA型ウイルスの血清疫学一次期流行ウイルス型の検討一, 第40回日本細菌学会東北支部総会, 青森市 (1986)
- 5) 栄賢司たち: RD細胞に対するコクサッキーA群ウイルスの感受性: 臨床とウイルス, 11, 160-163 (1983)
- 6) Yolken R. H, et al: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detection and Identification of Coxsackieviruses A, Infect. Immun., 31, 742-750, 1981
- 7) Lowry O. H, et al: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)

- 8) 右田俊介：免疫化学，中山書店，159—164（1972）
- 9) 佐藤宏康たち：ヒトロタウイルス免疫抗体を用いた E L I S A 法によるロタウイルスの検出について，秋田県衛生科学研究所年報，29，59—62（1985）
- 10) Nakane P. K：Conjugation of Peroxidase with Immunoglobulins，J. Histochem. Cytochem.，18，134—136（1970）
- 11) 森田盛大たち：1976～1977年度の微生物感染症定点観測成績について，秋田県衛生科学研究所報，22，65—90（1978）
- 12) 佐藤宏康たち：秋田県におけるCoxsackieA群ウイルスの侵襲像について，秋田県衛生科学研究所報，28，77—82（1984）
- 13) O. Nishio, et al：Identification of Group A Coxsackieviruses by Immune Adherence Hemagglutination, Japan. J. Med. Sci. Biol., 36, 199—207（1983）
- 14) 鈴木利壽たち：補体結合試験によるコクサッキーA群ウイルスの同定法，臨床とウイルス,11, 237—239（1983）
- 15) 中村忠義たち：群馬県におけるコクサッキーA群ウイルスの疫学（1973年～1980年），群馬県衛生公害研究所年報，13，49—52（1981）