

ELISA法を用いたCox.A群ウイルスの同定 (第2報)

佐藤 宏 康* 安部 真理子* 森田 盛大*

I 緒 言

前報では哺乳マウス (SM) で分離されたコクサッキー A 群ウイルス (CAV) 10 型の同定は二抗体法による ELISA 法で可能であることを報告した¹⁾。

本報では同様の方法が CAV-6 型についても可能かどうかを検討した。さらに、既知のウイルス量を糞便乳剤中に添加し、糞便中の CAV を直接本 ELISA 法によって検出できるかどうかを検討した。最後に CAV-6 型と CAV-10 型を含む糞便から直接分離同定することを試みたので、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

CAV-6 型 (Gdula 株) は予研、腸内ウイルス部より分与を受けた。

2. 組織培養細胞

青森衛研より分与された RD 細胞を用いた、FCS を 5% に含む MEM ハンクス液で培養した。

3. 哺乳マウス (SM)

感染価測定、ウイルスの分離同定に使用した SM は当所で交配させた dd 系マウスで、生後 72 時間以内に使用した。

4. 被検ウイルス株

昭和 61 年度の定点観測調査で、SM を用いて分離同定された CAV-6 型 32 株、その他の型 9 株の合計 41 株を使用した。

5. 糞便材料

ヘルパンギーナの患者より採取した糞便材料のうち、SM で CAV-6 型と 10 型の存在が確認された材料、それぞれ 2 及び 1 検体を用いた。

B 方法

1. ウイルス分離同定, 感染価測定法

分離は SM への腹腔内接種法により、また感染価測定及び同定の場合は SM への皮下接種法により行なった。

2. SM による免疫抗原の調整及び正常 SM 抗原の調製法

図 1 及び 2 に示した方法で行なった。分画は 10 本に分け採取した。

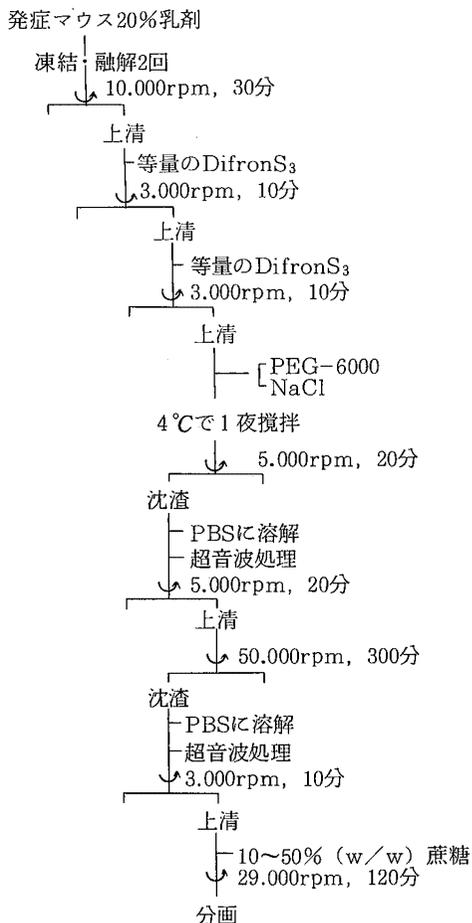


図 1. SM による免疫抗原の調製

* 秋田県衛生科学研究所

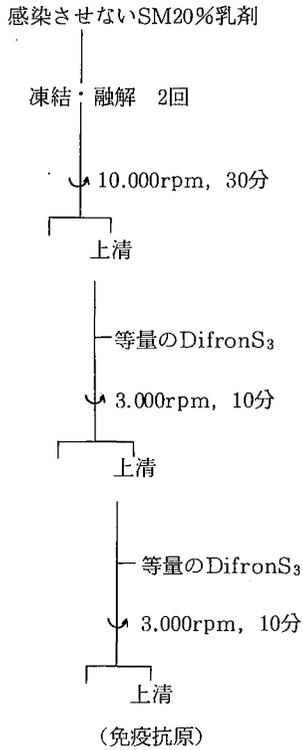


図2. 正常SM抗原の調製

3. RD細胞による免疫抗原の調整法

ルー氏型培養ビンを用いてRD細胞を単層に培養した。3日後PBSマイナスで2回洗浄したのち、RD細胞に3代馴化したGudula株5mlを接種、60分間吸着させた。さらにPBSマイナスで2回洗浄したのち、血清を含まないイーグルのMEM45mlを入れCPEが十分出現するまで37℃で静置培養した。以下は図3により免疫抗原を精製した。分画は10本に分け採取した。

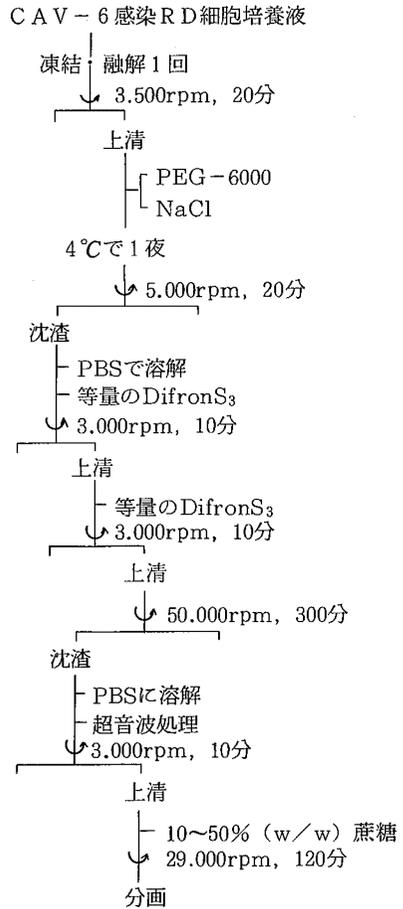


図3. RD細胞による免疫抗原の調製

4. 免疫方法, IgGの調整法, 蛋白の測定およびゲル内沈降反応

すべて前報¹⁾に準じて行なった。

5. 被検ウイルス株の処理及びELISA法

処理方法は前報¹⁾に準じて行なった。ELISA法は図4に示した。抗CAV-6型ウサギIgGの吸光度(O・D)から抗正常マウスウサギIgGのO・Dを差し引いたO・Dが0.1以上を陽性として判定した。

6. 糞便材料の濃縮処理

CAV-6型及び10型を含む糞便をPBSマイナスで10%乳剤としたのち, 10,000rpm30分間遠心し, その上清をダイフロンS3で2回処理した。PEG-6000とNaClにて濃縮した。CAV-10型を含む糞便材料については限外濾過(アミコン社, PM-10)にて再度濃縮した。

7. 予備実験

SMで増殖させたCAV-6型を $10^{7.5}$, $10^{6.5}$, $10^{5.5}$, $10^{4.5}$ LD₅₀/0.05mlに希釈し, 各々の2mlとCAVを含まない10%糞便乳剤198mlと混合した(表1)。これらを濃縮前10%乳剤とした。次にII-6により各々を濃縮処理した。それぞれの感染価はSMを用い, またO・DはELISA法で測定した。

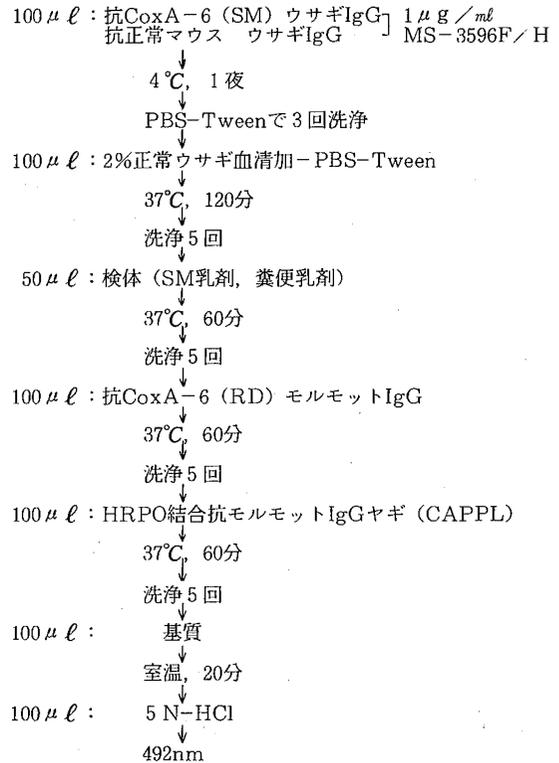


図4. ELISA法

表1 予備実験

実験No.	CAVを含まない10%糞便乳剤	CAV-6型 2ml添加 LD ₅₀ /0.05ml	含まれる 予想ウイルス LD ₅₀ /0.05ml	濃縮前10%乳剤	
				LD ₅₀ /0.05ml	O・D
1-1	198ml	$10^{7.5}$	$10^{5.5}$	$10^{5.5}$	0.150
2-1	198ml	$10^{6.5}$	$10^{4.5}$	$10^{4.0}$	0.043
3-1	198ml	$10^{5.5}$	$10^{3.5}$	$10^{3.5}$	0.046
4-1	198ml	$10^{4.5}$	$10^{2.5}$	$10^{2.5}$	0.024

実験No.	濃縮後 (PEG-6000, NaCl)			
	沈 渣		上 清	
	LD ₅₀ /0.05ml	O・D	LD ₅₀ /0.05ml	O・D
1-2	$10^{6.5}$	0.404	$10^{3.5}$	0.073
2-2	$10^{5.5}$	0.234	$10^{2.0}$	0.036
3-2	$10^{5.0}$	0.054	$10^{1.5}$	0.034
4-2	$10^{4.0}$	0.023	$10^{1.0}$	0.016

Ⅲ 成 績

A 免疫抗原, 免疫血清及びIgGの性状

1. 免疫抗原

図1及び図3により10本に分画された免疫抗原はいずれの場合も最大感染価は分画3, 4に認められた。図1で精製された抗原はSMで 10^{10} LD₅₀/0.05ml, 図3で精製された抗原はRD細胞で $10^{7.5}$ TCID₅₀/0.1mlを示した。

2. 免疫血清

Ⅲ-A-1の免疫抗原をウサギ及びモルモットに免疫して得られた免疫血清の抗体価はRD細胞で測定した場合, 抗CAV-6型ウサギ血清10,240倍, 抗CAV-6型モルモット血清160,000倍以上であった。

3. IgGの性状

抽出された各IgGの性状は図5のとおりであった。すなわち, 抗CAV-6型ウサギIgGと抗CAV-6型モルモットIgGはCAV-6型粗抗原と1本のバンドを形成し, 正常SM抗原とは反応しなかった。

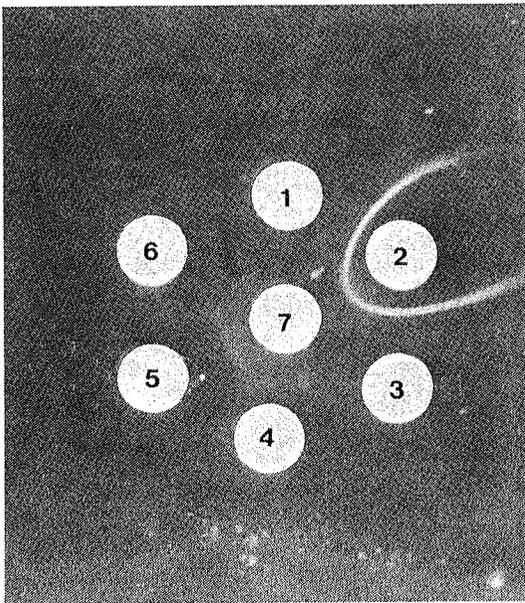


図5 IgGの性状

- 1, 4. 抗CAV-6 (SM) ウサギIgG
2. CAV-6 (SM) 粗抗原
- 3, 6. 抗CAV-6 (RD) モルモットIgG
5. 正常SM抗原
7. 抗正常 (SM) 抗原ウサギIgG

B IgGコーティング濃度の検討

イムノプレート (MS-3596F/H) を用いて抗CAV-6型ウサギIgGのコーティング濃度を検討した。0.5 μ g/mlから10 μ g/mlの範囲では1.0 μ g/mlの場合が, 抗原濃度希釈とO・Dの間に直線性が認められた (図6)。

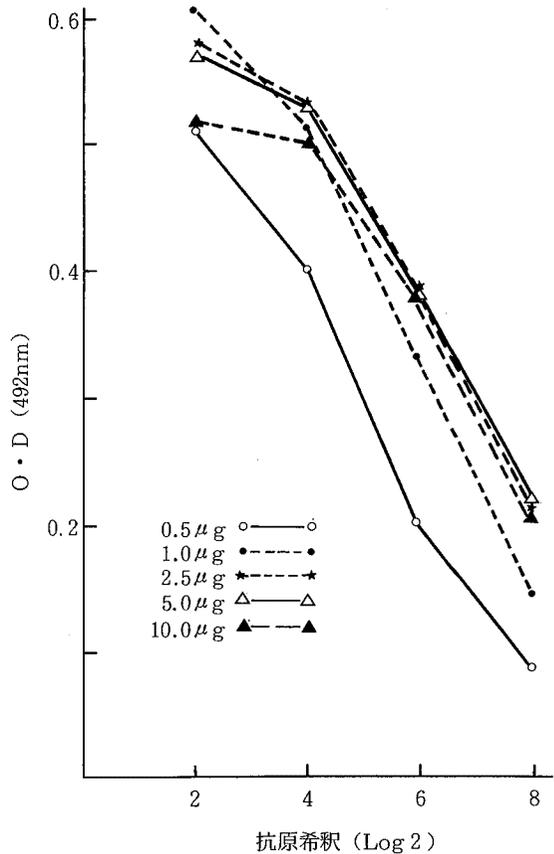


図6. IgGコーティング濃度の検討

C 特異性の検討

コーティングするIgG濃度を1.0 μ g/mlとした場合の特異性を検討した。すなわち, CAV-9型を除くCAV-1から10型 (SM継代株) を反応させた。成績は図7に示したとおり, 反応したのはCAV-6型のみで, 他の型はいずれもO・D0.1未満であった。

D ELISA法によるCAV-6型の同定

CAV-6型32株, その他の型9株を2倍階段希釈で反応させた成績を図8に示した。CAV-6型の場合は16倍希釈まで特異的に反応した。その他の株はいずれもO・D0.1未満であり, CAV-6型と明瞭に判別できた。

E 感染量(価)とO・Dの関係

両者の関係をIgGコーティング量 $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ と $5.0\mu\text{g}/\text{ml}$ について検討した。いずれの場合も抗原希釈 10^3 で直線性を示したが, O・Dが0.1以上を示すのは $10^{5.5}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ 以上のときであった。すなわち, 感染マウス乳剤中のウイルス量が $10^{5.0}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ 以下では検出できないことを示していた(図9)。

F 予備実験

CAVが糞便中にいかなる濃度で含まれるとき検出可能かをさらに検討した。SMで増殖させたCAVをCAV

を含まない糞便に添加して, 感染価とO・Dを測定した(表1)。濃縮前の10%糞便乳剤では $10^{5.5}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ のときO・D0.150(実験No.1-1)であったが, 濃縮後では $10^{6.5}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$, O・D0.404(実験No.1-2)となりいずれも検出可能であった。一方濃縮前(実験No.2-1)では $10^{4.0}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$, O・D0.043の場合は濃縮後(実験No.2-2) $10^{5.5}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$, O・D0.234となり濃縮後に検出可能であった。

G 糞便中のウイルス検出

濃縮前は破線, 濃縮後のO・Dは実線で図10に示した。CAV-6型の場合濃縮前 $10^{3.5}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ から濃縮後 $10^{5.3}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ となった場合はO・D0.1以上となり検出可能であった。濃縮後も $10^{3.0}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ の場合は検出できなかった。CAV-10型の場合は濃縮後さらに限外濾過を行ない $10^{5.5}\text{LD}_{50}/0.05\text{ml}$ まで濃縮した場合には検出可能であった。

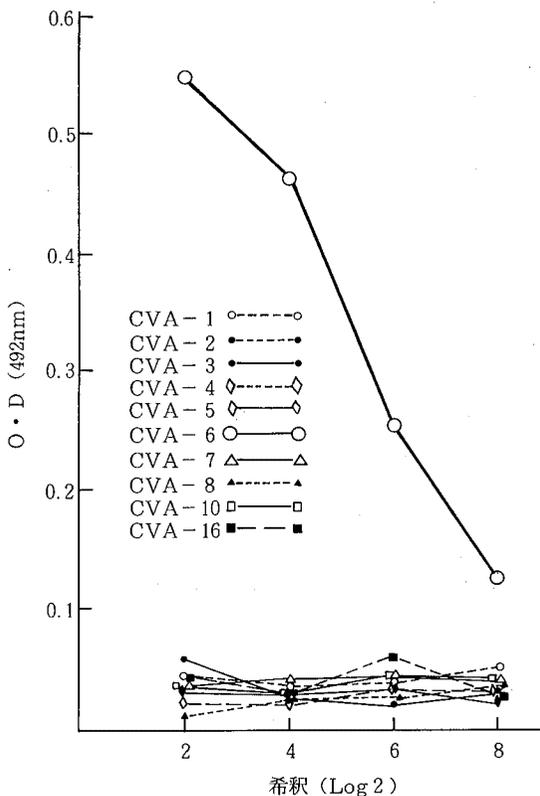


図7. 特異性の検討

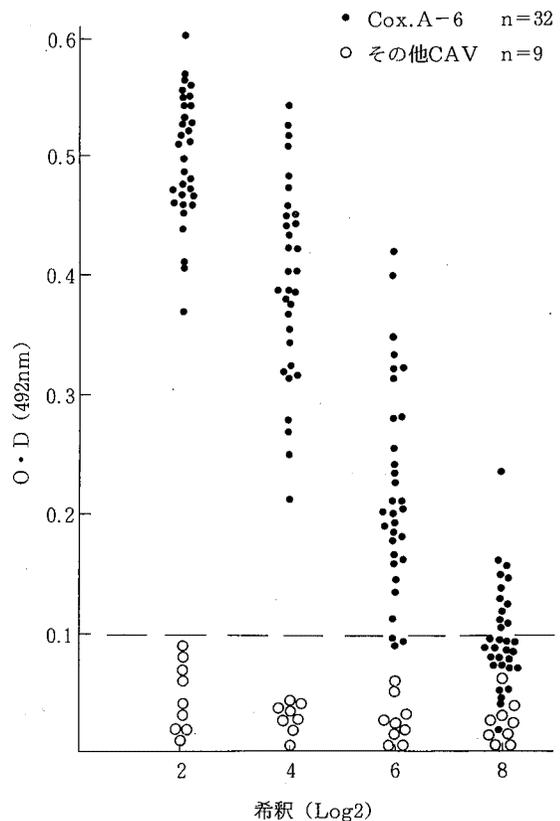


図8. ELISA法によるCAV-6型の同定

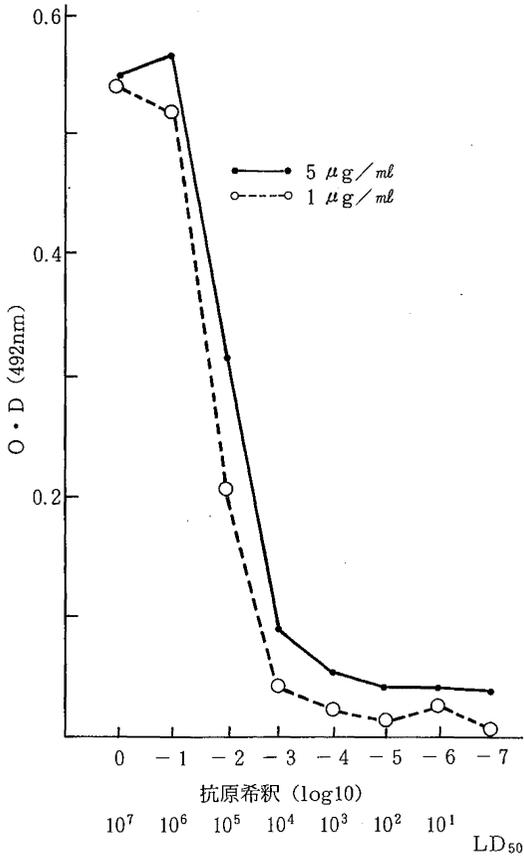


図9. 感染量とO・Dの関係

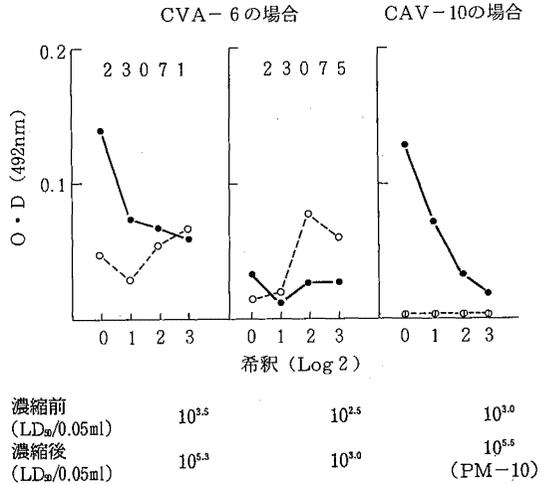


図10. 糞便中のウイルス検出

ELISA法で検出できるものと考えられた。

一方、糞便材料から直接ウイルスを検出する場合にはSMによるウイルス増殖過程の代わりに、何らかの方法を用いて検出可能なレベルまでウイルス濃度を上げる必要がある。試みとしてPEG6000とNaClによる濃縮法を用いた。この方法は濃縮に多量の糞便抽出液を処理する必要があること、また、10^{5.0}LD₅₀/0.05ml以下のウイルス濃度ではさらに限外濾過法などで再濃縮する必要があるなど、実験室内診断法としては不利な点が多かった。

今後、糞便の少量処理で濃縮効果のよい方法をみい出すと同時に、ウイルス検出限界を10^{3.0}LD₅₀/0.05ml程度にまで感度と特異性を改善する必要があると考えられた。

IV 考 察

前報¹⁾ではCAV-10型を用い、ELISA法を二抗体法とサンドイッチ法で比較検討し、二抗体法で良好な成績が得られることを報告した。

本報では同様の方法を用いCAV-6型について検討した結果、SMを用いて分離されるCAV 1~4型、5~8型および10型には反応せずCAV-6型とのみ反応し、特異性が高いことが示された。また、CAV-6型同定のためのELISA法も特異性の高いことが示され、CAV-6型の同定に有用であると考えられた。

予備実験及び感染量とO・Dの関係から得られた成績では、O・D 0.1以上で検出できる下限は10^{5.5}LD₅₀/0.05ml程度であった。しかし、患者の糞便10%乳剤中のウイルス量は10^{2.5}~10^{3.5}LD₅₀/0.05ml程度である場合が多く、本ELISA法では検出不可能であると考えられたが、SMに接種、発症後のSM10%乳剤中には10^{6.0}~10^{7.5}LD₅₀/0.05ml程度のウイルスが存在する。このような場合には本

V ま と め

1. 二抗体法によるELISA法を用いてCAV-6型の同定が可能であった。
2. 本ELISA法でのウイルス検出の下限は感染価として10^{5.5}LD₅₀/0.05mlであった。
3. 糞便材料からウイルスを直接分離同定するためには多量の材料処理が必要であり、実験室内診断法としては改良の余地がある。

本論文の要旨は第36回日本感染症学会東日本地方部会総会（東京都，1987）において発表した。

文 献

- 1) 佐藤宏康たち：ELISA法を用いたCox. A群ウイルスの同定，秋田県衛生科学研究所報，30，74-80（1986）