

IV 報 文

ELISA法を用いたCox.A群ウイルスの同定(第3報)

佐藤宏康* 安部真理子* 森田盛大*

I 緒言

第1報ではCoxsackie A群ウイルス(CAV)10型を用い、サンドイッチELISA法と二抗体を用いたELISA法を比較検討した¹⁾。また、第2報ではCAV6型を用いて糞便中のCAVを直接検出できるか否かを検討した²⁾。本報では哺乳マウス(SM)を用いて多数分離されるCAV2, 4, 5, 6, 10型について二抗体ELISA法による同定システムを作成し、SMを用いた中和同定法と比較したので、その成績について報告する。

II 材料と方法

A. 材料

1 使用ウイルス株

予研、腸内ウイルス部より分与されたCAV標準株

1型(Tompkins), 2型(Fleetwood), 3型(Olson), 4型(High Point), 5型(Swartz), 6型(Gdula), 7型(Parker), 8型(Donovan), 10型(Kowalik)を用いた。

2 組織培養細胞及び哺乳マウス

既報²⁾に準じて行なった。

3 被検ウイルス株

1984~1987年の間に秋田県内においてSMで初代分離された90株を用いた。

B. 方法

1 免疫抗原の精製法と免疫方法

既報²⁾に準じて行なった。すなわち、一種類のウイルスについてRD細胞由来とSM由来の二種類の精製抗原を調製し、前者はモルモット、後者はウサギへ免疫した。

2 IgGの抽出及び蛋白質量の定量法

既報²⁾に準じて行なった。

3 二抗体を用いたELISA法

既報²⁾に準じて行なった。概略は図1に示した。

4 SMによる中和同定法

分離株のマウス10%乳剤を1/1000に希釈し等量の抗CAV各型ウサギ血清の50~100単位と37°C 60分間反応後、SMの皮下に接種し7日間発症の有無を観察した。中和同定法で使用した抗CAV各型ウサギ血清はELISAに使用した抗血清ではなく、各型ウイルス感染マウス10%乳剤をダイフロンで2回処理した遠心上清を免疫抗原として作製した。

III 成績

A. 免疫抗原と免疫血清の性状

表1に示した。すなわち、SM由来、RD由来いずれの場合も最大感染価はフラクション番号3, 4(F3, F4)を中心に分画された。SM由来での感染価は $10^{8.5}$ LD₅₀/0.05 ml以上であり、RD由来抗原では $10^{6.5}$ TCID₅₀/0.1 ml以上であった。いずれもF3, F4, をプール後、免疫抗原として使用した。免疫血清の抗体価はすべてRD細胞を用いて測定したが、SM由来では抗CAV10型が1280倍と低く、他の型は4万倍以上であった。一方、RD細胞由来抗原で得られた抗CAVモルモット血清はいずれも2万倍以上であった。

B. 反応条件の検討

1 コーティング量と反応時間の検討

図2に示した。左図はCAV6型について検討した成績で $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ の $100 \mu\text{l}$ すなわち $0.1 \mu\text{g}/\text{well}$ が適当なコーティング量と考えられた。また、右図は一次抗体と抗原の反応時間を検討した成績で37°C, 60分より37°C, 60分, 4°C overnightの条件でより高い吸光度が得られた。

2 基質濃度とブロッキング剤の検討

図3に示した。すなわち、0.2 M リン酸, 0.1 M クエン酸バッファー(pH 4.8) 100 mlに含まれるオルソフェニ

*秋田県衛生科学研究所

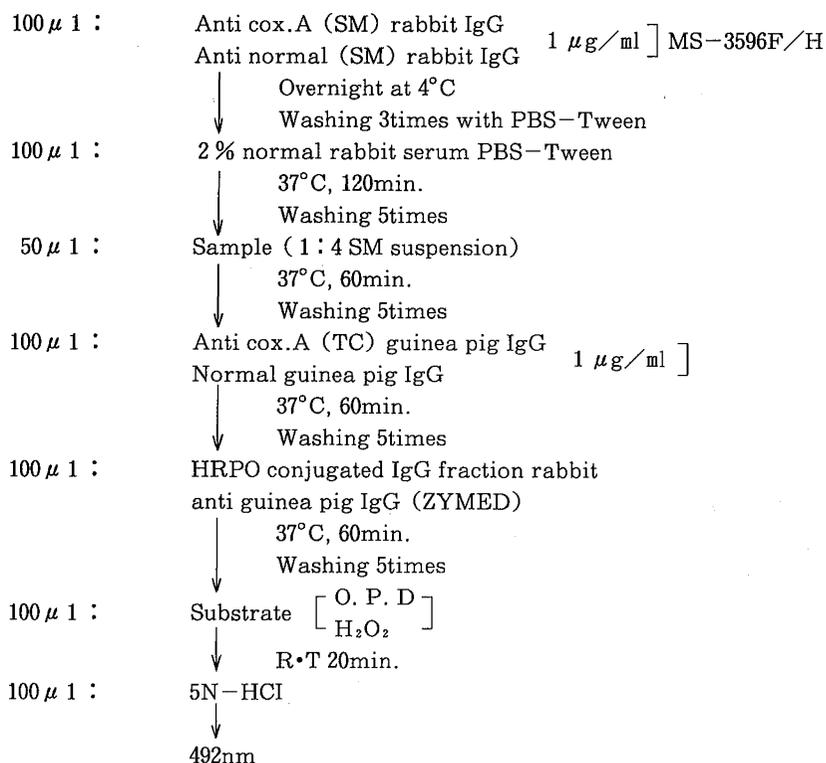


図1. ELISAの方法

表1 免疫血清の性状

	CAV 血清型									
	2		4		5		6		10	
SM由来										
分画 No.	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
感染価 log ₁₀										
LD ₅₀ /0.05ml	8.5	> 8.5	8.0	6.5	> 9.0	> 9.0	10.0	10.0	> 8.5	> 8.5
抗体価 (ウサギ)	> 40960		> 40960		> 40960		40960		1280	
RD細胞由来										
分画 No.	3	4	3	4	3	4	3	4	3	4
感染価 log ₁₀										
TC ₅₀ /0.1ml	8.0	> 8.5	8.5	9.0	7.0	6.5	7.5	7.5	8.5	7.75
抗体価 (モルモット)	20480		> 40960		> 40960		> 40960		> 40960	

表2 特異性の検討

ウイルス	抗CAV IgG					感染価 log ₁₀ LD ₅₀ /0.05ml	
	2	4	5	6	10		
CAV (SM)	1	0.000*	0.037	0.016	0.037	0.014	7.0
	2	<u>1.627</u>	0.027	0.015	0.000	0.085	
	3	0.021	0.050	0.000	0.060	0.098	
	4	0.012	<u>1.071</u>	0.000	0.015	0.082	
	5	0.034	0.038	<u>1.465</u>	0.009	0.037	
	6	0.022	0.039	0.000	<u>1.374</u>	0.084	
	7	0.001	0.036	0.000	0.016	0.057	
	8	0.009	0.038	0.000	0.024	0.053	
	10	0.000	0.062	0.031	0.000	<u>1.289</u>	
CAV (RD)	2	<u>0.950</u>	0.059	0.011	0.000	0.000	
	4	0.002	<u>1.071</u>	0.071	0.001	0.015	
	5	0.000	0.048	<u>1.465</u>	0.000	0.001	
	6	0.040	0.050	0.027	<u>1.537</u>	0.000	
	10	0.064	0.064	0.055	0.011	<u>1.431</u>	

* 492nmでの吸光度

レンジアミン (OPD) と H₂O₂ の濃度を検討したところ、OPD 200 mg, H₂O₂ 100 μ l で高い吸光度が得られた。OPD 濃度を上げると溶解難であり、H₂O₂ 添加量を増加させると呈色する。一方、ブロッキング剤を 2% 正常ウサギ血清、2% 牛血清アルブミンフラクション V (BSA)、および市販 (大日本製薬 KK) のブロックエースを用いて検討した。いずれも大きな差はなく使用可能であった。

C. 特異性の検討

CAV 各型を ELISA 法で測定した成績を表 2 に示した。

上段は SM 継代の CAV 1 ~ 10 型 (9 型除く)、下段は RD 細胞継代株である。いずれも該当する株に対してのみ高い吸光度を示した。

D. ELISA と中和試験による同定法の比較

図 4 に示した。すなわち、たて軸は ELISA による型別、横軸は中和試験による型別の成績を示した。■ は 5 検体、● は 1 検体、★ は ELISA と中和の成績が不一致の例、○ は二種類のウイルスが混在し中和で同定不能であった例を示した。90 株のうち中和で 5 型 ELISA で 4 型が 1 例認められた。また、中和で同定不能であった 3 株のうち、2 株は ELISA で 5 型、1 株 (24143) は 5 型と 10 型に反応した。

E. 二つの血清型が分離された例

24143 株について表 3 に示した三つの系により確認試

験を行なった。すなわち、24143 株を 1 / 1000 に希釈後、PBS, 抗 CAV 5 型ウサギ血清 (10 倍希釈, 1000 単位), 抗 CAV 10 型ウサギ血清 (10 倍希釈, 1000 単位) の各々と等量混合し、37°C 60 分間反応後、SM の皮下に 0.05 ml 当り接種、発症した SM の 10% 乳剤を ELISA で同定した。(PBS + 24143) は初代分離株と同様 CAV 5 と 10 に反応した。(抗 CAV 5 型 + 24143) は CAV 10 型のみ、また、(抗 CAV 10 型 + 24143) は CAV 5 型とのみ反応し、24143 株は CAV 5 型と 10 型の二種類のウイルスを含んでいたことが確認された。

IV 考 察

近年 RD-18 S 細胞が CAV の分離に使用されているが、分離率は SM に及ばない⁹⁾。SM は CAV に高い感受性を示すが、飼育のための労力と費用が多額であることから敬遠されがちである。著者ら⁴⁾は 1976 年から秋田県において SM を用いて CAV の分離を始め、分離株の多くは CAV 2, 4, 5, 6, 10 型 5 種類の血清型で占められることを報告した⁹⁾。分離株の同定は SM による中和試験を用いてきた。

しかし、一般にはマウス免疫腹水を用いた補体結合試験 (CF) などが汎用されてきた。CF は迅速性はあるが、初代分離株では同定できない株が存在することが知られており継代 2 目株を用いる⁶⁾。そこで著者らは特異性と迅速性を重点に上記 5 種類の CAV について ELISA を用いた同定法を検討した。

既報⁹⁾のように特異性が高く、市販の試薬が利用でき

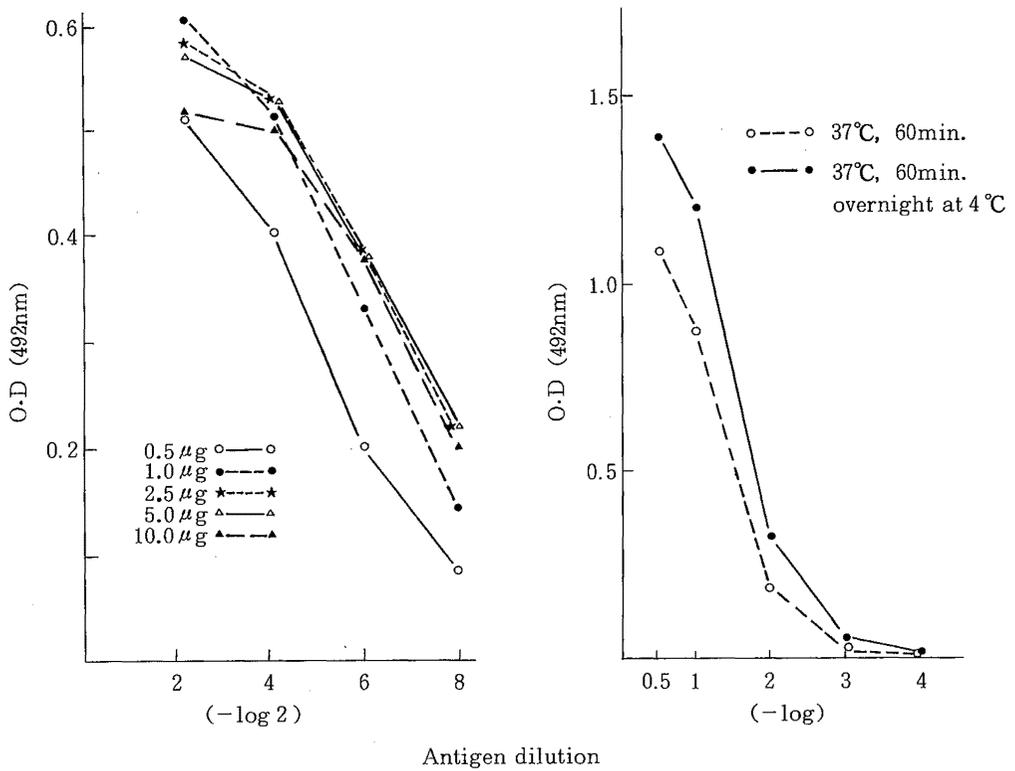


図2. コーティング量と反応時間の検討

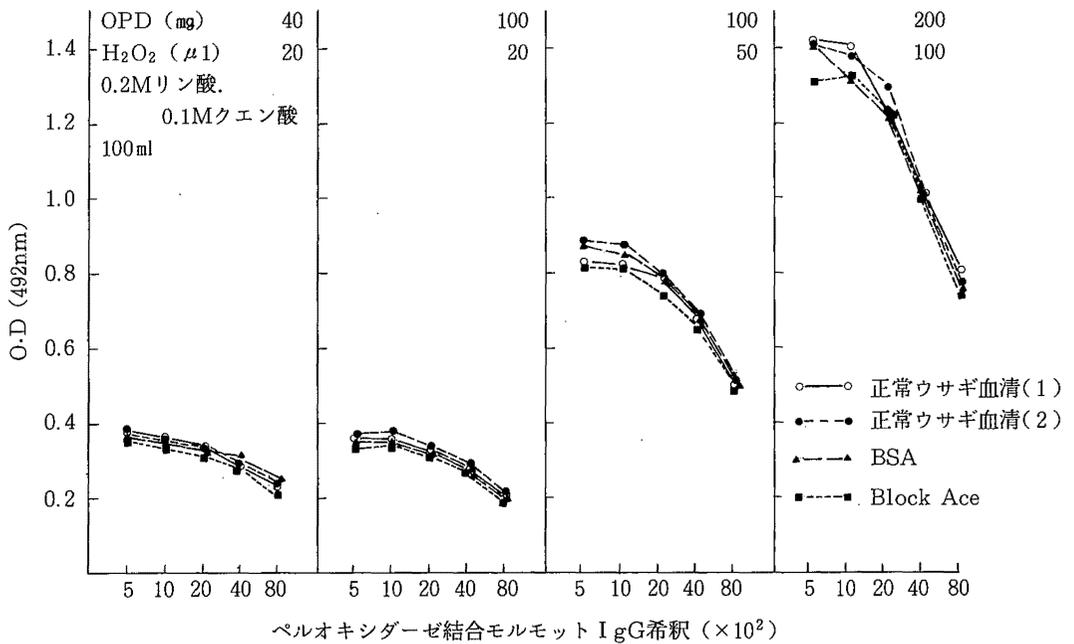


図3. 基質濃度とブロッキング剤の検討

表3 二つの血清型が分離された例

S M への 継 代	抗 CAV I g G				
	2	4	5	6	10
前 (初代分離)	0.000*	0.039	1.489	0.000	1.265
後					
PBS+24143	0.000	0.041	1.425	0.016	0.754
抗CAV-5 (1:10)+24143	0.000	0.033	0.007	0.000	1.096
抗CAV-10 (1:10)+24143	0.001	0.054	1.551	0.000	0.000

* 492nmでの吸光度

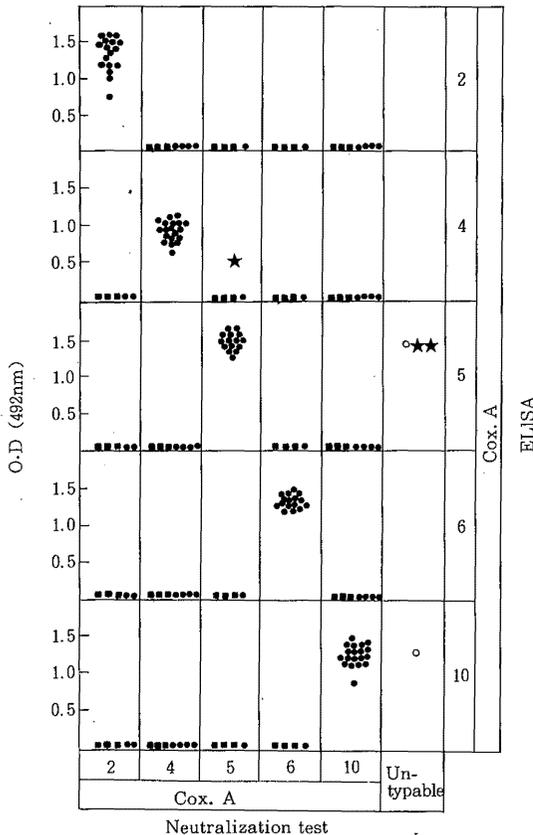


図4. ELISA法と中和試験法の比較

ることから二抗体を用いたELISA法を採用した。一種類のウイルスについて2種類の免疫血清を作製した。得られた免疫血清はSM由来の抗CAV10型ウサギ血清を除き高単位であった。抗CAV10型ウサギ血清は2度作製したが他のウイルスに比較し低い抗体価であった。これらの免疫血清から抽出されたIgGはマイクロオクタロニーでみるかぎり、いずれも正常マウス抗原と

は反応せず該当するウイルス粗抗原のみ反応した。しかし、免疫抗原に用いたF3, F4を電気泳動を用いて解析するとウイルスバンド以外に細胞あるいはSM由来のミオシン、アルブミンが含まれていることが判明した。SMで分離されるCAV1~10型(9型除く)に対しては特異性が高いことが示されたが、今後RD18-S, RDなど培養細胞で分離されるCAVを同定するためにはCAV9, 16型, エンテロウイルス71型, コクサッキーB群ウイルスに対して非特異性の有無を検討することが必要と考えられる。

次に反応条件を検討した。コーティング量はwell当たり0.1μg, また、反応時間は37°C60分, 4°C overnightの条件でより高い反応結果が得られたが、迅速性の点から37°C60分を用いた。基質の濃度を上げることにより吸光度を上昇させることができた。また、一次抗体にウサギIgGを用いたのでブロッキングに用いる蛋白は2%正常ウサギ血清を用いた。

中和試験で5型ELISAで4型の不一致例について検討した。中和試験に用いた抗CAV5型血清は160単位以上ではCAV4型と交差することが判明した。一時期200単位を用いたので、この時同定された株と推定された。以降64単位を使用している。また、中和試験で未同定、ELISAで5型の2株は感染価が高く50~100単位の抗血清では中和不十分であったことが解明された。一方、一分離株の中に2種類のCAVが含まれている場合にはELISAによる同定は有用であった。同様な例をCAV2型と10型について自験している。

CAVの流行は夏期に集中し、数種類の血清型が短期間に侵襲すること、かつ、2才以下の小児を中心に多発することを考慮すれば、同一分離材料から2種類のCAVが分離されることは十分に考えられる。

著者らが検討したCAV同定用ELISA法は迅速、特異性が高く、同一分離株中に含まれる異なる血清型をも型別が可能であった。また、多数の分離株を同定できるなど多くの利点を有していた。しかし、1株でも1枚の

イムノプレートが必要であるなど欠点も有していた。

今後、細胞で分離される CAV 16 型, エンテロウイルス 71 型についても検討し, 同定の一層の迅速化と簡便化を実現したい。

V ま と め

SM を用いて分離された CAV を迅速, 特異的に同定するため二抗体を用いた ELISA 法を検討した。本法の特異性は中和試験法と同等と推定された。また, 同一検体中に含まれる二種類の CAV を同時に同定でき, CAV の迅速同定法に有用と考えられた。

本論文の要旨は第 36 回日本ウイルス学会総会 (東京, 1988) 及び第 10 回衛生微生物技術協議会 (秋田市, 1989) 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)
- 2) 佐藤宏康たち: ELISA 法を用いた Cox.A 群ウイルスの同定 (第 2 報), 秋田県衛生科学研究所報, 32, 57—62 (1988)
- 3) 栄賢司たち: RD 細胞からのクローン株, RD-18 S のコクサッキー A 群とエコーウイルスに対する感受性および各種材料からのウイルス分離, 感染症学雑誌, 59 (7), 664—669 (1985)
- 4) 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)
- 5) 佐藤宏康たち: 秋田県における Coxsackie A 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)
- 6) 原稔: ウイルス実験学, 各論 (国立予防衛生研究所学友会編) 改訂二版, 147, 丸善 (1982)