

Enzyme-linked Immunosorbent Assayおよび Indirect Immunofluorescence Assayによる動 物血清中の抗Chlamydia抗体価測定

宮沢 博¹⁾ 芦原 義守¹⁾ 海保 郁男²⁾
時枝 正吉²⁾ 古屋 美人³⁾

Detection of Anti-Chlamydial Antibody in Animal Sera by Enzyme-linked Immunosorbent Assay and Indirect Immunofluorescence Assay

Hiroshi MIYAZAWA, Yoshimori ASHIHARA, Ikuo KAIHO
Masayoshi TOKIEDA, Yoshihito FURUYA

Summary

We have used two enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) for detection of chlamydial antibody in animal sera, i.e., indirect ELISA and competition ELISA. In the latter method, chlamydia genus specific monoclonal antibody was employed. When antibody levels of 48 pigeons sera determined by two ELISAs were compared to titers of indirect immunofluorescence assay (IFA), a significant degree of correlation was observed, and the sensitivity of the ELISAs were higher as well as IFA than complement fixation test. In the goats and sheep sera, little correlation was obtained between two ELISAs and IFA. The competition ELISA may be useful as a simple technique to detection of chlamydial antibody in the avian sera if anti immunoglobulin antibody not available.

I はじめに

Chlamydia psittaci (C.psittaci) は広く動物界に存在する人畜共通伝染病原体¹⁾である。感染動物との接触によりヒトに感染しオウム病を引き起こす。ヒトへの主な感染源は、オウム、インコなどのペット鳥、ハトなどの野鳥、ヤギやヒツジなどの家畜である。これら接触機会の多い動物の汚染状況を知ることは公衆衛生上の課題となっている。

現在、浸淫度調査を目的としたChlamydia抗体測定は、主にComplement Fixation (CF) によって行なわれているが、この方法は、同一の手技で各種動物の抗体測定ができる有用な方法である。しかし、検出感度は一般的に低く、また補体結合性のない一部の鳥類では測

定できない欠点を持っている²⁾。そこで調査をより詳細に行なうには、これに変わる方法の確立が必要である。今回我々は、Chlamydia抗体測定法として、indirect Enzyme-linked Immunosorbent Assay (indirect ELISA)、Chlamydia特異モノクローナル抗体を用いたcompetition ELISAとindirect Immunofluorescence Assay (IFA) を検討した。実験に供した血清は、ハト、ヤギ、ヒツジの血清で、その測定成績について報告する。

II 材料と方法

1. Chlamydia

国立予防衛生研究所ウイルス中央検査部より分与されたC.psittaci budgerigar No.1 (bud) 株を用いた。

2. 血清

千葉県千葉市内で捕獲されたハト48検体と、同県内で飼育されていたヤギ59検体、ヒツジ36検体の血清を用いた。使用時まで-20°C以下に保存した。

1) 杏林大学保健学部

2) 千葉県衛生研究所

3) 千葉県家畜衛生研究所

(1987年9月30日受理)

3. 抗血清

抗ハトIgG FITC標識ウサギ抗体 (ノルディック社), 抗ヤギIgG FITC標識ウサギ抗体 (E.Y社), 抗ヒツジIgG FITC標識ウサギ抗体 (ザイメッド社), 抗Chlamydiaモノクローナル抗体 (Bio-18, バイオソフト社), 抗マウスIgGペルオキシダーゼ標識抗体 (タゴ社)を用いた。FITC標識抗体はIFAとELISAの二次抗体として, ペルオキシダーゼ標識抗体はELISAの三次抗体として使用した。

4. indirect ELISA

1) 抗原

既報³⁾に従い, bud株を感染させたHeLa229細胞及び非感染の細胞を用いて, それぞれbud抗原, 正常抗原を調整した。

2) 手順

bud抗原を0.05M炭酸-重炭酸緩衝液, pH9.6で0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈し, これに20倍濃度のBSAを添加後, 0.1

mlづつポリエステル製96穴平底マイクロプレート (No. 6595, コースター社)の各穴に分注, 4°C 1晩吸着させた。正常抗原も同様に操作した。プレートを0.5%Tween20加PBS (PBST)で3回, 3分洗浄した後, 1%BSA加PBSTで100倍に希釈した被検血清を0.1mlづつ分注, 室温, 2時間反応させた。洗浄後, 1%BSA加PBSTで希釈した抗IgG FITC標識抗体 (ハト=25,000倍, ヤギ=4,000倍, ヒツジ=25,000倍)を0.1mlづつ加え, 室温, 1時間反応させた。洗浄後, 抗ウサギIgGペルオキシダーゼ標識抗体 (8,000倍)を0.1mlづつ加え, 室温, 1時間反応させた。洗浄後, 基質 (o-phenylendiamine 40mg, 35% H_2O_2 40 μl , 0.05M リン酸-クエン酸緩衝液 pH5.0 100ml)を0.1mlづつ加え, 室温30分間反応後, 4N- H_2SO_4 を50 μl づつ加えた。492nmで吸光度を測定した。抗体量はbud抗原と正常抗原の吸光度差 (ELISA値)とした。

5. competition ELISA (原理を図1に示す)

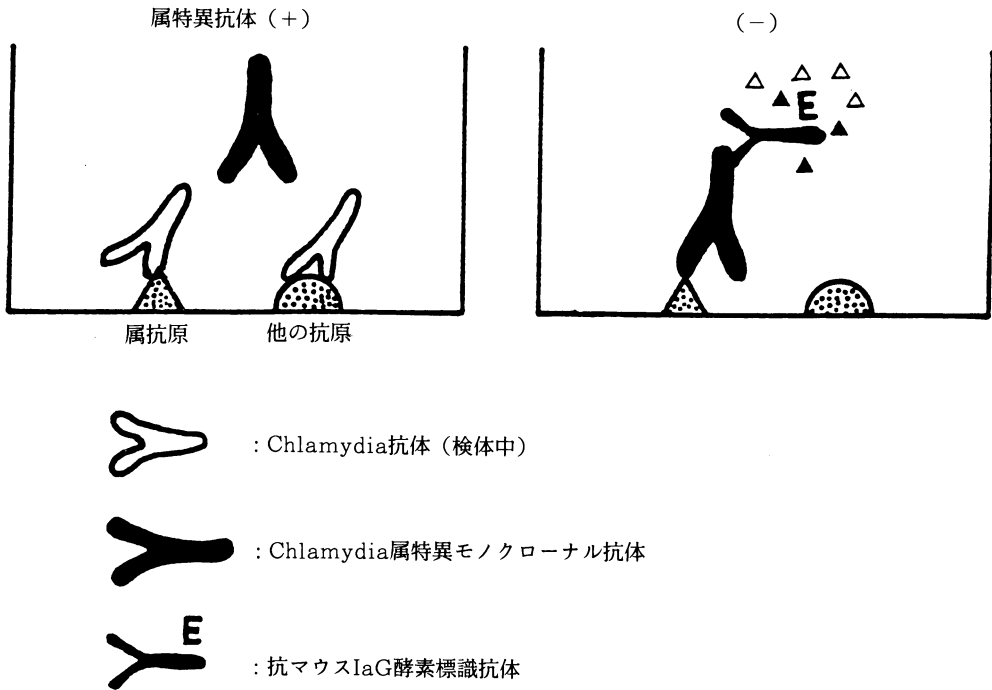


図1 competition ELISAの測定原理

1) 抗原

bud抗原液 (975 $\mu\text{g}/\text{ml}$) に1%デオキシコール酸ナトリウムを同量加え, 37°C 1時間加温後, 15,000 \times 8 30分間遠心し, 上清を抗原とした⁴⁾。

2) 手順

デオキシコール酸ナトリウム処理抗原を100倍に希釈し, 0.1mlづつ穴に加え, 4°C 1晩マイクロプレートに

吸着させた。洗浄後, 10倍希釈血清を0.1ml加え, 室温3時間反応させた。洗浄後, 抗Chlamydiaモノクローナル抗体 (1,000倍)を0.1mlづつ加え室温1時間反応させた。洗浄後, 抗マウスIgGペルオキシダーゼ標識抗体 (2,000倍)を室温1時間反応させた。以下はindirect ELISAと同様に操作した。抑制率は (1.0-検体血清穴の吸光度/検体未添加穴の吸光度) \times 100として求めた。

6. IFA

1) 抗原スライドの作製

HeLa229細胞へ約10%の細胞が感作するように希釈したbud株を接種し、37°C、1時間の吸着後、37°C、30分間培養した。細胞をPBSで3回洗浄し、ガラスビーズで剥離後、PBSで10⁶コ/mlに調整し、10 μl づつ15 well multitest slide (Flow社)の各穴に分注した。直ちに60°Cで乾燥し、アセトンで30分間固定後、-80°Cに保存した。

2) 手順

血清を1:5~1,280まで0.5%BSA-PBSで4倍階段希釈し、抗原スライドの穴に約10 μl づつ、37°C、45分間反応させた。PBSで3回、3分間づつ洗浄後、抗IgG FITC標識抗体(ハト、ヤギ、ヒツジいずれも

50倍)を約10 μl づつ、37°C、45分間反応させた。洗浄後、風乾、封入し、UV励起光200倍で観察した。封入体が明らかな蛍光を発する最高血清希釈倍数をもって、抗体価とした。

7. CF

市販のCF抗原を用い、微生物検査必携⁹⁾に従って実施した。8倍以上を抗体陽性とした。

III 結果

1. indirect ELISAにおける非特異反応の抑制

今回検討した3方法のなかで、非特異反応が最も問題となるのは、indirect ELISAと考えられた。抑制方法を種々検討し、我々は次のような方法を用いた。(1)抗原

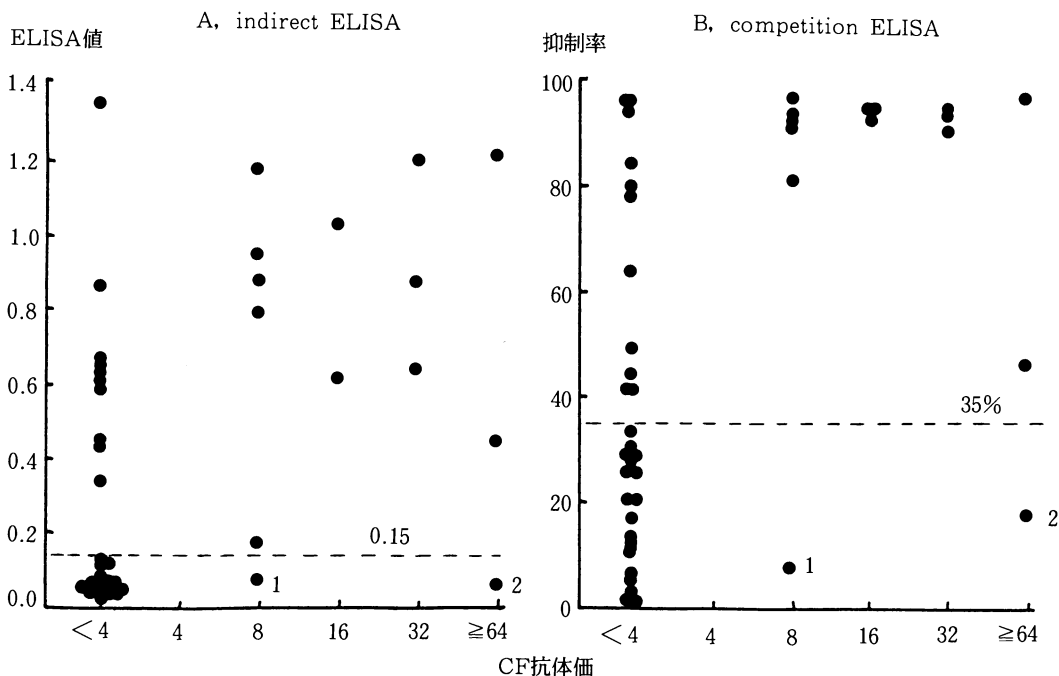


図2 ハト血清におけるCFとindirect ELISA, competition ELISAの比較

にBSAを蛋白質量で20倍量加え、吸着させる、(2)PBS T中のTween20濃度を通常量の10倍の0.5%で用いる。前者は陽性血清の反応にはほとんど影響なく、陰性血清のbud抗原への吸着を効果的に抑えた。後者は正常抗原への吸着を抑え、陽性、陰性血清のELISA値の差を大きくする効果がみられた。

2. ハト血清の成績

CFとindirect ELISAの比較成績を図2Aに示した。相関係数は0.54であった。CF抗体価8倍以上では、2例(No.1, 2)を除き、全例ELISA陽性(cut off値=

0.15はIFA抗体価5倍以下の22例のELISA値平均+3S.D.として求めた)であり、両者はよく一致していた。しかし、8倍未満では32例中10例が、ELISA陽性で、この例は全てIFA陽性であったことから、この不一致は、検出感度の差と考えられた。

CFとcompetition ELISAの比較成績を図2Bに示した。CF抗体価8倍以上の例は、ほとんどが80%以上の抑制を示した。また、CF抗体価8倍未満の例でも40%以上の抑制を示す例が多く見られた。IFA抗体価5倍未満の例の抑制は最高32%であったことから、cut off

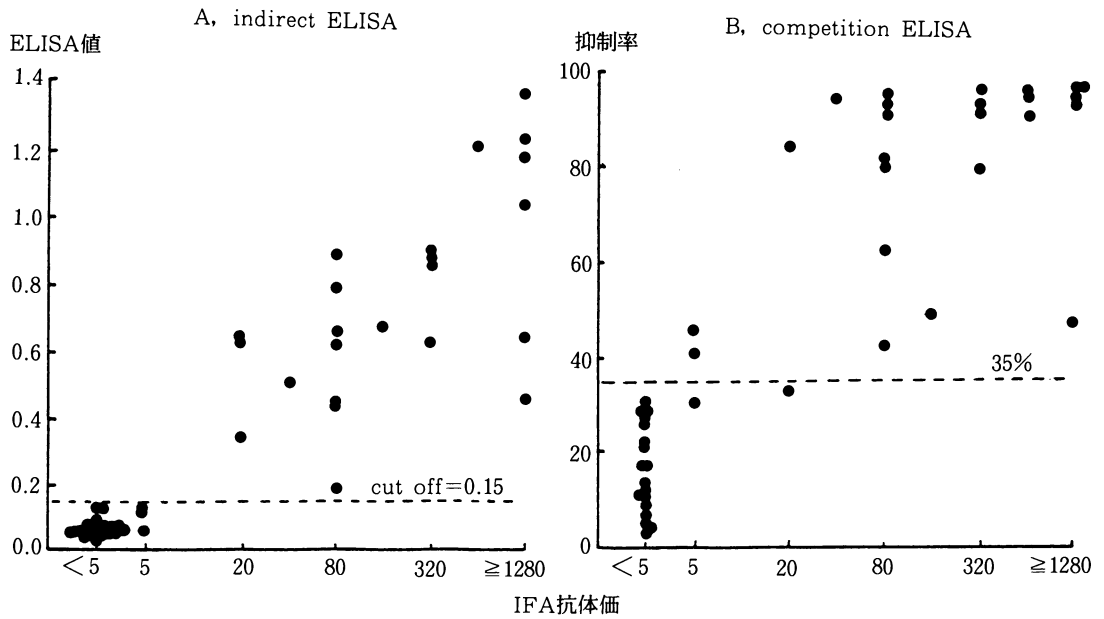


図3 ハト血清におけるIFAとindirect ELISA, competition ELISAの比較

は35%とした。検体No.1, 2はindirect ELISAと同様cut off以下であった。

IFAとindirect ELISA, IFAとcompetition ELISAの比較成績を図3 Aと3 Bに示した。相関係数は0.90と0.88で良好な相関性を示した。IFA抗体価5倍の3例はindirect ELISAでは陰性であったが, competition ELISAでは2例が陽性と判定された。

各測定法の抗体陽性率を表に示した。CFが31.3%と最も低く, その他はその約1.5~1.7倍の陽性率であった。

		陽性(%)	判定基準
C	F	31.3	8倍以上
indirect ELISA		45.8	0.15 "
competition ELISA		47.9	35% "
I F A		54.2	5倍 "

表1 ハト血清における陽性率

3. ヤギ, ヒツジ血清の成績

ヤギ, ヒツジ血清のIFAとindirect ELISA, IFAとcompetition ELISAの比較成績を図4, 5に示した

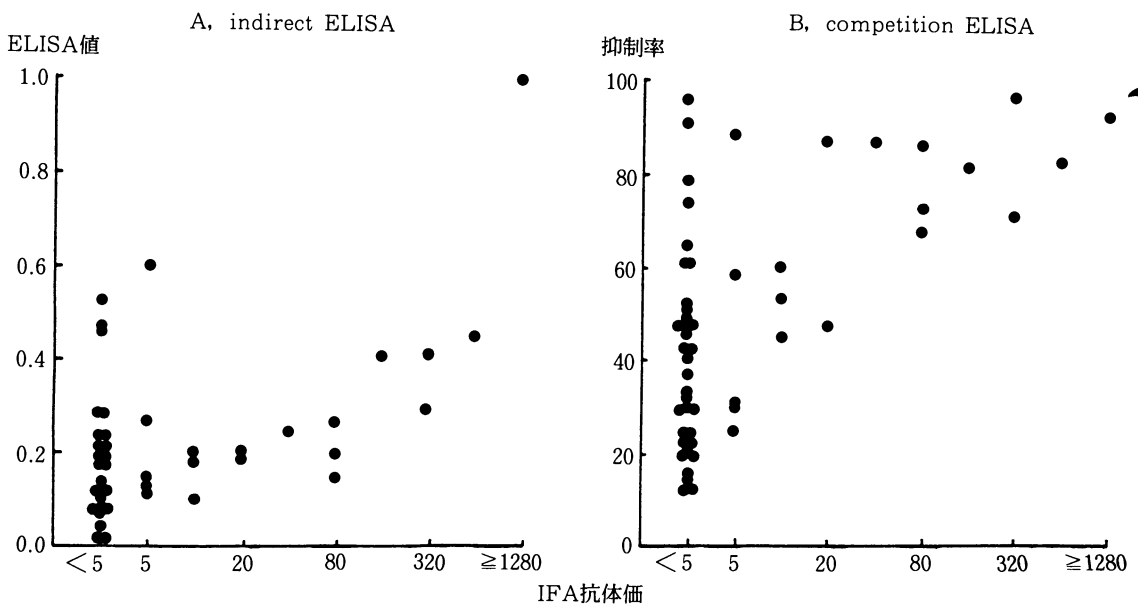


図4 ヤギ血清におけるIFAとindirect ELISA, competition ELISAの比較

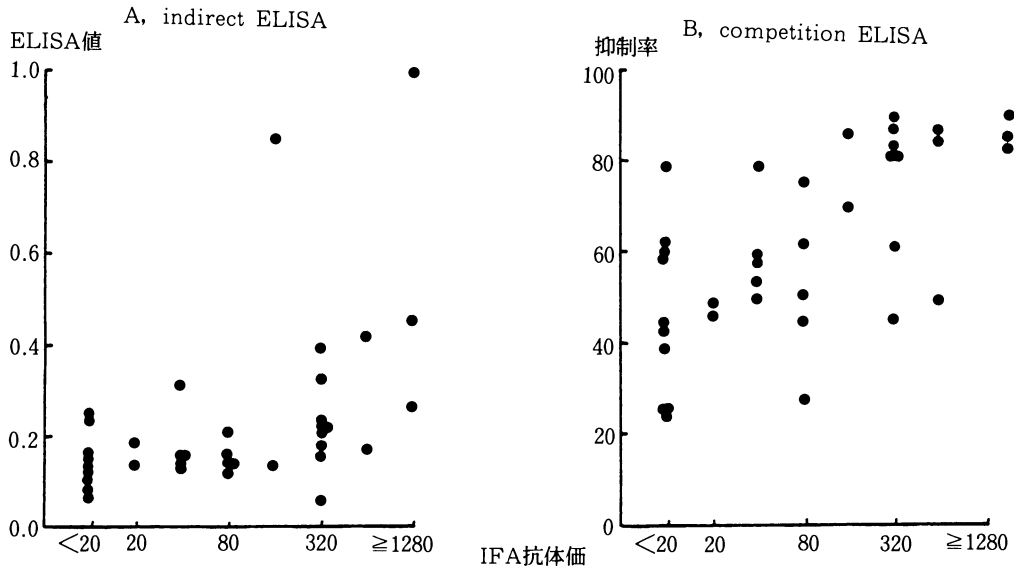


図5 ヒツジ血清におけるIFAとindirect ELISA, competition ELISAの比較

(ヒツジのIFAは非特異反応が強かったために20倍から行なった)。IFAとindirect ELISAでは、どちらの血清でもELISA値は全体に低く、IFA抗体価5倍未満(20倍未満)とそれ以上の差は明確ではなかった。IFAとcompetition ELISAでは、IFA抗体価と抑制率との間に正の相関(ヤギ $r=0.56$, ヒツジ $r=0.63$)が認められた。

IV 考察

*C. psittaci*の血清学的な型分けは、まだ明らかではないが、少なくとも9種類に分けられるという⁶⁾。おそらく*C. trachomatis*と同様、数多くの血清型が存在し、また、動物ごとに特徴的な血清型があり、その交差の度合いも様々と予想される。このような中で、各種動物血清中のChlamydia抗体を測定するには、属特異抗体を測定することが最良と考えられる。しかし、現在は適当な方法がない。今回我々は、セキセイインコ由来のbud株を抗原作成のために用い、各種動物のChlamydia抗体測定法の確立を試みた。

異なる原理の3方法を検討したが、各方法の抗原と検出される抗体および特徴は、次のように考えられる。

1) indirect ELISAではbud株のElementary Bodyを抗原とした。型(ここではsubtypeを含む)及び属特異抗体が検出される。検出される抗体のクラスは、IgG(二次抗体による)であり、多数検体の処理に向く。ただし、二次抗体の入手が困難な動物では測定できない。

2) competition ELISAでは、bud株をデオキシコル酸ナトリウム処理して得た可溶性成分を抗原とした。

属特異モノクローナル抗体とその対応する抗原との反応を、血清中抗体でBlockすることにより、属特異抗体が検出される(図1)。この場合、検出される抗体は、全ての免疫グロブリンクラスであり、抗Ig抗体が不要である。

3) IFAでは感染細胞内の封入体を抗原とした。属特異抗体が検出され、クラスは、IgGである(二次抗体による)。顕微鏡下で判定するため、特異性、信頼性も高い。二次抗体の問題はindirect ELISAと同様である。

ハト血清におけるCFとindirect ELISA, CFとcompetition ELISAの陽性一致率はともに86.6%で、陰性一致率は60~70%であった。陰性一致率が低い原因は、CFの検出感度が低いためと考えられた。IFAとindirect ELISA, IFAとcompetition ELISAの相関性、一致率はともに高く(図3)、検出感度も大差がなかった。これら3法の抗体陽性率(表1)は、CFの31.3%にたいして、その約1.5~1.7倍であり、浸淫度はCFによって得られた値よりもかなり高いことがわかった。ハト血清については、検討した3法の差は少なく、いずれもCFに変わりうる高感度な方法と考える。他の鳥類の抗体測定には、二次抗体の問題から、competition ELISAが適当と思われる。

ヤギとヒツジ血清では、IFAが高抗体価でもindirect ELISAは低値である例が多くみられた。このことは、これら動物に感染していた*C. psittaci*の抗原性がbud株とはかなり異なっていたことを反映したものである。IFAとcompetition ELISAでは、どちらの血清でも正の相関が認められた(図4, 5)。しかし、IFA抗体価5倍(20倍)未満で高い抑制率を示す例があり、これが

特異的な反応か否かは、今後C.psittaciの分離成績と合せ、検討しなければならない。

V まとめ

indirect ELISA, competition ELISAとIFAによる、動物血清中Chlamydia抗体の測定を検討した。ハト血清では、3法は高い相関性と一致率を示し、CFにかわる高感度な優れた測定法であることがわかった。特に、competition ELISAは抗Ig抗体が用意できない鳥類については、有用と思われた。ヤギ、ヒツジ血清では、indirect ELISAによる測定は困難であった。また、IFAとcompetition ELISAはその特異性について、C.psittaciの分離成績と比較し検討する必要があると思われた。

文献

- 1) 勝部泰治, 影井昇, 丸山務: 人畜共通伝染病, 近代出版(東京), 89-92, 1983.
- 2) 福田郎子: ウイルス, 21, 1-9, 1971.
- 3) 宮沢博, 坂内久一, 芦原義守, 荻原敏且, 志賀定詞, 赤尾頼幸: 臨床とウイルス, 13, 442-445, 1985.
- 4) 厚生省: クラミジア研究班, クラミジア検査法, 14-15, 昭和60年.
- 5) 厚生省監修: 微生物検査必携, ウイルス, リケッチア検査, 日本公衆衛生検査協会(東京), 65-83, 1978.
- 6) J.A.PEREZ-MARTINEZ and J. STORZ: Intect, Immun, 50, 905-910, 1985.