

# 平行線定量法を用いた風疹のELISA法 による抗体測定

春日 邦子, 十川 知子, 北山 秋雄, 時技 正吉,  
市村 博, 太田原美作雄

## Detection of Antibody to Rubella Virus by ELISA with Parallel Line Assay Method

Kuniko KASUGA, Tomoko TOGAWA, Akio KITAYAMA  
Masayoshi TOKIEDA, Hiroshi ICHIMURA  
and Misao OHOTAWARA

### 1 はじめに

ELISA法は、1971年Engvall & Perlmannの報告<sup>1)</sup>以来、迅速、簡便で感度の高い方法として、多くのウイルス抗原<sup>2)</sup>、抗体の検出<sup>2,3,4)</sup>に用いられている。しかし、測定で得られる吸光度は、反応条件のわずかな違いにより容易に変動し、吸光度の再現性を高めることは非常に困難である。そのため、今までのELISA法による抗体測定の多くは、定性的なものであった。

著者らは、バイオアッセイの分析法である平行線定量法<sup>5)</sup>を用いて、ELISA法による抗体の定量を試み、これまで百日咳<sup>6)</sup>およびムンプス<sup>6)</sup>において良好な結果を得ている。今回、妊婦における感染が問題となる風疹について、ELISA法による抗体測定を試みたので報告する。

### 2 材料および方法

#### 1. 材料

##### 1) 抗原

風疹ウイルスは、BHK-21細胞で増殖させ、粗遠心で細胞残渣をおとした後、ポリエチレングリコールで1,000倍に濃縮されたものを、国立予防衛生研究所から分与を受けた。蛋白量は2,500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、HA価は40,000倍であった。

##### 2) ヒト血清

測定条件の検討のための陽性血清は、HI抗体512倍以上のものを、陰性血清は、HI抗体陰性で風疹の既往

歴のないものを用いた。平行線定量を行うための標準血清は、風疹罹患後1年以内のHI抗体256倍のものを用いた。また、被検血清は、1987年に採取した成人血清18検体を用いた。

##### 3) 酵素標識抗体

ペルオキシダーゼ標識H鎖特異的抗ヒトIgGヤギ血清(Cappel社)を用いた。

##### 4) 基質液

使用時に混合したリン酸-クエン酸緩衝液(pH5.0) 100mlに $\sigma$ -フェニレンジアミン40mgを溶かした後、30%過酸化水素水40  $\mu\text{l}$ を加え基質液とした。

### 2. 方法

#### 1) ELISA法

マイクロプレートは、Immulon I 平底プレート(Dynatech社, No.011-010-3350)を用いた。

0.05M炭酸緩衝液(pH9.6)で希釈した抗原を各ウェル100  $\mu\text{l}$ ずつ入れ、4°Cで1晩吸着を行った。翌日、0.05%Tweem20を加えたリン酸緩衝液(PBS/T)で3回洗浄後、血清を0.1%ウシ血清アルブミンを加えたPBS/T(0.1%BSA-PBS/T)で希釈し、その100  $\mu\text{l}$ をウェルに入れ、37°C 1時間反応させた。次に、各ウェルを上記と同様に洗浄し、0.1%BSA-PBS/Tで希釈した酵素標識抗体を100  $\mu\text{l}$ 入れ、37°C 1時間反応させた。さらに、各ウェルを同様に洗浄し、基質液100  $\mu\text{l}$ を入れ、暗所で30分間反応させた。最後に、4 N硫酸25  $\mu\text{l}$ を加え反応を停止させ、MR580(Dynatech社)で波長492 nmにおける吸光度を測定した。

#### 2) 平行線定量法

##### ①血清反応

各プレートに標準血清を配置した。標準血清は、100倍から1600倍まで2倍段階希釈を行い、1希釈3~4ウェ

ル繰り返しを行った。

また、被検血清は、100倍から800倍まで2倍階段希釈を行ない、1希釈3ウェル繰り返しを行った。

②相対力価 (Relative Potency : RP) の算出

以下の計算手順が自動的に実行されるように、マイクロコンピューター (NEC980/シリーズ) によってプログラムを開発した。

A) 標準血清と被検血清の希釈倍数と吸光度を対数変換する。

B) 標準血清および被検血清それぞれの直線性を検定する。

C) 2本の回帰直線の平行性の検定をする。

D) 同一の吸光度における2本の回帰直線の距離 (M) を算出する。

E) Mのantilog, 即ち相対力価を算出する。

3) 赤血球凝集抑制試験 (HI 試験)

予研法<sup>9)</sup>に準じて行った。抗原は、市販品 (デンカ生研) を使用した。

III 結果

1. 測定条件の検討

マイクロプレートに固相化する抗原濃度を検討した。濃縮した抗原を200倍 (蛋白量12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) から2倍段階希釈で4段階希釈した。陽性血清は、100倍、200倍、400倍、800倍で、陰性血清は、100倍で反応させ、酵素標識抗体は8000倍を用いた。図1にその結果を示し、抗原濃度は蛋白量で示した。陽性血清の吸光度は、抗原濃度に伴って上昇し、約6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  でプラトーになった。陰性血清の吸光度は、抗原濃度約1.5~6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で0.03以下と低く、12.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  で若干高くなっている。以上より、陽性血清の各希釈の吸光度が1.1以下で、陰性血清の吸光度の低い、約3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (800倍希釈) を使用濃度とした。

さらに、酵素標識抗体の使用濃度を検討した。200倍希釈の陽性血清、陰性血清を用いて、1000倍から2段階希釈した酵素標識抗体を反応させた。希釈とともに吸光度は低下していった。陽性血清と陰性血清の吸光度の差が大きく、陽性血清の吸光度が1.0以内の8000倍を用いることとした。

2. ELISA法による抗体の測定

HI抗体陽性および陰性の成人血清18例について、ELISA法による抗体の測定を行った。表1に示したように、被検血清の直線性が認められ、標準血清との平行性が認められたものは、18例中15例 (83.3%) であった。

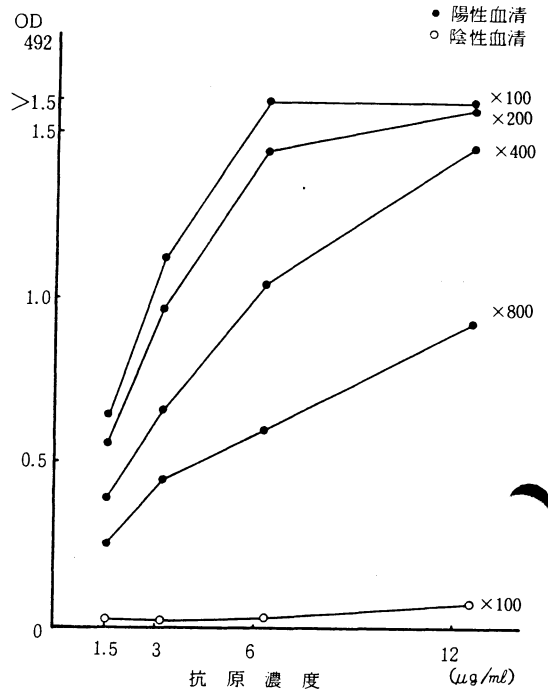


図1. 抗原濃度による吸光度の変動

表1. ELISA法による相対力価とHI価

No.	HI 価	ELISA法		相対力価
		直線性の* 検 定	平行性の* 検 定	
1	<8	×	×	
2	<8	○	○	0.001
3	<8	○	○	0.005
4	<8	○	○	0.007
5	<8	○	○	0.010
6	8	○	○	0.014
7	64	○	○	0.564
8	64	○	○	0.376
9	64	○	○	0.086
10	64	○	○	0.169
11	64	○	○	0.136
12	64	○	○	0.077
13	64	○	○	0.380
14	64	○	○	0.164
15	≥512	○	○	1.062
16	≥512	○	×	
17	≥512	○	○	0.811
18	≥512	○	×	

\* 危険率1%水準で検定を行った。

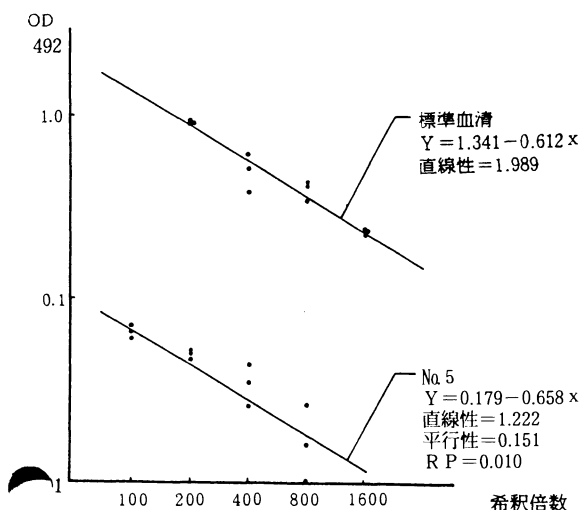


図2. No.5 (HI抗体陰性血清)の平行線定量

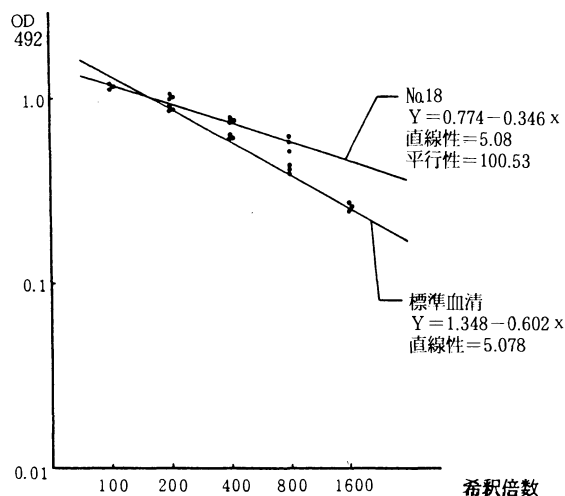


図4. No.18 (HI ≥ 512)の平行線定量

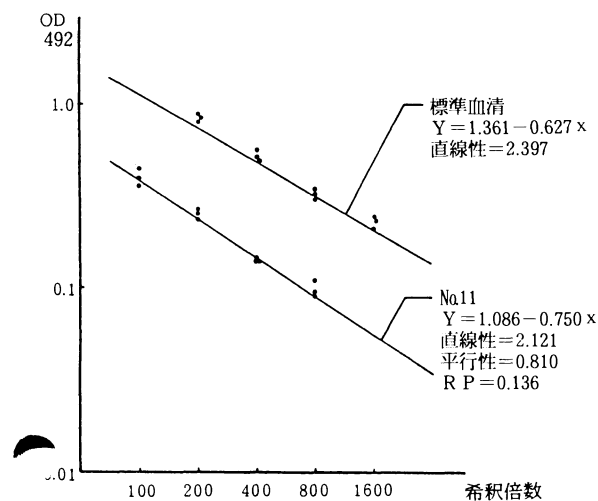


図3. No.11 (HI抗体陽性血清)の平行線定量

その中で、HI抗体陰性血清No.5とHI抗体陽性血清No.11の平行線定量の結果を図2、図3に示した。

HI抗体の高いNo.15~No.18の被検血清は、血清希釈倍数と吸光度の用量反応直線が、低希釈で傾きが小さくなっていた。その中で、No.15とNo.17は、100倍を除いた3希釈で平行性が認められた。しかし、No.16とNo.18は、図4に示すように400倍希釈まで吸光度の低下が小さく、平行性が認められなかった。

相対力価は、表1に示すように、HI抗体陰性血清では、0.01以下で、HI抗体64倍および512倍以上の血清に比較して明らかに低い値であった。

### 3. 再現性

表1の6検体について、約2週間に4回繰り返し測定を行い、日較差による相対力価の再現性をみた。(表2) No.3とNo.6の変動係数が、46.8%、68.1%とやや大きかった。これは、相対力価が小さいため、試験ごとに得られる吸光度の変動が、相対力価に影響をおよぼしたためと推測される。他の4検体の変動係数は、15.3%~25.3%で、すぐれた再現性を示した。

表2. 日較差による相対力価の変動

No.	相対力価 (R P)			
	平均	標準偏差	変動係数(%)	信頼区間
3	0.055	0.025	46.4	0~0.118
6	0.097	0.066	68.1	0~0.202
7	0.450	0.102	22.7	0.288~0.612
11	0.212	0.046	21.6	0.139~0.285
13	0.449	0.069	15.3	0.340~0.558
17	0.709	0.179	25.3	0.424~0.994

## IV 考察

ELISA法は、操作が簡単で、ラジオイムノアッセイと同程度に感度の高い方法として、さまざまな分野で実用化されている。しかし、測定で得られる吸光度は、再現性に乏しく、定性的な値でしかない。

著者らは、これまでELISA法に関する基礎的な検討を行った。そして、吸光度測定には、基本的にプレート間の誤差、ウェル間の誤差等が変動因子として存在しており、これらの変動因子は、平行線定量を用いることによってコントロールされることを明らかにした。<sup>10)</sup>

今回、成人血清18例について風疹のELISA法による抗体測定を試み、大部分の血清は平行線定量が成立した。しかし、HI抗体の高い血清は、低希釈で用量反応直線の傾きが小さくなっていた。これは、低希釈において固相に吸着させた抗原量より抗体量が多いため、吸光度が低く抑えられたことが考えられる。また、系列希釈した酵素と基質を反応させて発色させた溶液の用量反応直線は、吸光度がおよそ1.0以上になると、傾きが真の値より小さくなる傾向がみられた。これは、測定機器の性能の限界を示したものと思われる。これらより、低希釈における吸光度が1.0以上の高い値を示し、平行線定量が成立しない場合は、希釈範囲を高く設定する必要性が推測される。

相対力価の日報差による再現性を検討したところ、相対力価の平均が0.2以上の被検血清 (No.7, No.11, No.13, No.17) は、変動係数が高いもので25.3%と小さい値であった。この値は、他の報告<sup>3,10)</sup>に比較しても再現性の良好な成績であった。

## V まとめ

平行線定量を用いた風疹のELISA法による抗体測定を行ったところ、本法の有効性と優れた再現性が認められた。

稿を終えるに当たり、風疹ウイルスを分与いただきました国立予防衛生研究所麻疹部松野哲也先生に深謝します。

## 文献

1) Engvall, E., Perlmann, P. (1972): Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA III Qu-

antitation of specific antibody by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J. Immunol.*, 109, 129-155.

- 2) 曲泰弘, 田中智之, 伊藤端子, 出口雅経, 小池通夫, 宮本博行 (1981): ELISA法による糞便中ヒトロタウイルスの検出および血中抗体価の測定, *臨床とウイルス*, 9-2, 99-105.
- 3) Voller, A., Bidwell, D. E. (1975): A simple method for detecting antibody to rubella. *Br. J. exp. Pathol.*, 56, 338-339.
- 4) Igarashi, A., Bundo, K., Matsuo, S., Makino, Y., Lin, W. J. (1981): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) on Japanese encephalitis virus. I Basic condition of the assay on human Immunoglobulin. *Trop. Med.*, 23, 49-59.
- 5) 田島マサ子, 武田史子, 安田和人 (1983): ELISA法を中心とした風疹抗体価の測定, *臨床とウイルス*, 11-1, 41-46.
- 6) Finney, D. J. (1978): Statistical method in biological assay. third edition, Charles Griffin and Company.
- 7) 内村真佐子, 北山秋雄, 矢崎広久, 市村博, 堀内喜信, 江下倉重 (1986): マイクロELISA法による抗体測定における血清蛋白および標識抗体の影響について, *千葉衛研報告*, 10, 26-29.
- 8) 北山秋雄, 春日邦子, 十川知子, 時枝正吉, 市村博, 太田原美作雄, 平山宗宏 (1987): マイクロELISA法によるムンプス抗体測定. 第一報 平行線定量の有効性, *臨床とウイルス*, 15-3, 369-372.
- 9) 厚生省監修 (1978): 微生物検査必携 ウイルス・リケッチア検査 第2版, 日本公衆衛生協会, 351-354.
- 10) 坂田宏子, 山田章雄, 菱山美智子, 杉浦昭 (1984): Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によるムンプス抗体測定, *臨床とウイルス*, 12-1, 81-86