

ELISA法によるワクシニアウイルス抗体の測定について

伊藤 浩三, 窪谷 弘子, 平山 久子, 齋加 志津子

Determination of vaccinia virus antibodies by ELISA

Kozo ITO, Hiroko KUBONOYA, Hisako HIRAYAMA
and Shizuko SAIKA

I はじめに

天然痘は1977年10月のソマリア事例を最後に地球上で新たな自然感染の発生はなく、1980年5月WHOにより、根絶宣言がなされている。我が国では1954年以後原発真性患者の発生はなく、天然痘の国内侵入の脅威がなくなったことから、1976年以降定期種痘が廃止されている。しかし、近年、バイオテロ等による天然痘の再興が懸念されたことから²⁾国家危機管理の一環として、2001年より痘瘡ワクチンの製造が再開されており、現在、ワクチンの国家備蓄対応がなされている。また、国内の緊急テロ対策として天然痘対応指針が厚生労働省より示されている。

ワクシニアウイルスの抗体価測定法としては、旧来よりウイルス中和反応、補体結合反応、寒天ゲル沈降反応、赤血球凝集阻止反応等々が知られている。バイオテロ発生時の緊急時対策の円滑をはかる上では、多数検体を簡便且つ迅速に測定処理する手法が望まれる。この目的のため、ELISA抗原を作出して、抗ヒトIgGペルオキシダーゼ標識抗体を用いたELISA間接法による痘瘡ウイルス抗体の測定を行った。既報のRK13細胞を用いたブラック中和試験¹⁾と同一被検血清を用い、中和抗体価と比較を加えて、ELISA法の導入を検討したので報告する。

II 材料と方法

1) ELISA抗原の作製

抗原作製用のウイルス培養細胞は、SPFファーム由来の仔ウサギ腎臓をデスパーゼ消化し、凍結保存した細胞を用いた。細胞を増殖培養液(5%牛胎児血清、0.11%重曹加イーグルMEM液)に浮遊し、225cm²プラスチック製カルチャーボトルを用い、37℃で3日間静置培養を行った。100%コンフルエントの細胞表面をPBSで2回洗浄した後に使用した。

使用ウイルスは、乾燥細胞培養痘瘡そうワクチン「LC16・チバ」製造株¹⁾の親株であるLister (Elstree) 株(通称LO株)をm.o.i.=1に調製し、準備した細胞に接種した。培養ボトル当り50mLのウイルス培養液(0.11%重曹加イーグルMEM液)を加えて37℃48時間ウイルス培養後、細胞変性の生じた感染細胞をセルスクレーパーでかきとり、1,500rpm20分間遠心処理を行って、感染細胞

を採取した。ウイルス抗原の可溶化は、採取した細胞を培養液の1/10量(5mL)に還元した後、界面活性剤のNP-40を0.2%に添加し、氷浴中で30分間ソニック処理を行って抽出した。抽出抗原を10,000rpm30分間遠心処理を行い、夾雑部分を取り除いた遠心上清液をELISA陽性(ウイルス)抗原とした。作製した抗原は、小分けして-80℃に凍結保存した。

ELISA陰性(対照)抗原は、ウイルス未接種の細胞を前述と同様の操作で調製した。

2) 被検血清

被検血清は、旧千葉県血清研究所職員で乾燥細胞培養痘瘡そうワクチン「LC16・チバ」種痘前採血に協力の得られた16名と種痘後3から4週目に54名から採血を行い、遠心分離後56℃30分非働化して使用した。また、種痘廃止以前の牛皮型痘瘡ワクチン(大連株、池田株、Lister株)による抗体保有状況調査のため、医学系専門学校生66名(年齢18から54歳)及び医院受診者96名(年齢0から90歳)の保存血清を使用した。

3) ELISA法

ELISA用の96穴、平底イムノプレートを用い、マルチチャンネルピペットを使用して、0.01M PBS (pH7.2)で希釈した陽性抗原を第1列と第2列に、陰性抗原を第3列と第4列に夫々、50μL/穴宛て加えた後、4℃1夜吸着させ、抗原の固相化を行った。

ウォッシャーを用いて、洗浄液(0.05%Tween20加PBS)を各穴に満たし、3回洗浄した。前述の保存被検血清(56℃30分間非働化済み)を希釈液(0.05%Tween20及び0.2%BSA加PBS)で50倍に希釈して用いた。希釈した被検血清を抗原プレートの端から4列毎に50μL/穴宛て加えた後、37℃60分間反応させた。

再び、ウォッシャーを用いて、洗浄液を各穴に満たし、3回洗浄した。抗ヒトIgG(γ鎖特異的)ペルオキシダーゼ標識抗体(MBL製)を希釈液で2000倍に希釈し、反応プレートに50μL/穴宛て加えた後、37℃60分間反応させた。

再度、ウォッシャーを用いて、洗浄液を各穴に満たし、3回洗浄した。基質液は、0.2Mリン酸水素ナトリウムと0.1Mクエン酸を等量混和し、o-フェニレンジアミンを0.15%になるように加えて溶液をつくり、それに過酸化水素水を0.05%になるように加えて調製した(使用直前に調製)。基質液を反応プレートに100μL/穴宛て加えた後、遮光下で室温、30分間反応、発色させた。

3N硫酸を反応プレートに100μL/穴宛て加えて反応を停止させた後、吸光度計を用いて、490nmにおける吸光度(OD₄₉₀)を測定した。

被検血清のELISA抗体価は、陽性及び陰性抗原夫々2穴の吸光度平均値を求め、両者の吸光度の差の値を採用した。

4) 中和試験法

RK13細胞を用いたブラック中和試験を行い、対照ウイルスに対する50%ブラック抑制率を示す血清希釈倍数を算定し、被検血清の中和抗体価とした¹⁾。

なお、本調査、研究の公表等に関しては、千葉県衛生研究所疫学倫理審査委員会の承認を得たものである。

III 成績

1) 反応の特異性と抗原量

図-1a, 1bは、陽性及び陰性抗原を50から6400倍に希釈し、固相化後、中和抗体価強陽性(64倍)、弱陽性(4倍)、及び陰性(4倍以下)の3種類の被検血清を用い、ELISA反応を行った成績である。陰性抗原に対する被検血清の反応は認められなかった。他方、陽性抗原に対する陽性血清の反応は、抗原希釈の低い部位で反応の抑制が認められたが、特異反応は明白であった。

中和試験のカットオフ値は4倍である。4例の中和抗体価4倍の被検血清を用い、ELISA反応を行い、平均OD₄₀₀値0.3を示す抗原希釈量360倍を算出した。以下の試験には、至適抗原量として

抗原を360倍に希釈してELISA反応を行った。

2) 非特異反応値の除去

ELISA反応における非特異反応値の排除法としては、同一検体(血清)の陽性抗原の吸光度値から陰性抗原の吸光度値の差の値をELISA抗体価として取り扱うことが多い。本反応系でこの手法の採用に関する妥当性の可否について検討した。図-2は、74例の中和抗体陰性血清について、陽性抗原(y軸)及び陰性抗原(x軸)に対する反応についてプロットして相関を調べた結果、高い相関(r=0.806)が得られた。また、陰性抗原に対する中和抗体陰性血清(74例、平均OD₄₀₀値=0.137±0.059)及び陽性血清(104例、平均OD₄₀₀値=0.147±0.056)の反応は図-3のとおりであった。これらの両グループ間において統計学的に有意な差は認められなかった(p>0.05)。以上の成績から、同一検体の陽性抗原の吸光度値から陰性抗原の吸光度値を差し引いた値を特異反応値(ELISA抗体価)として取り扱うことに問題がないことが判明した。

3) カットオフ値の設定

種痘廃止後世代の中和抗体陰性血清74例のELISA抗体価の頻度を図-4に示した。ELISA抗体価は0.135から-0.051の範囲でほぼ正規分布を示し、平均0.036±0.034であった。カットオフ値は、標準偏差値の3倍を平均値に加えて算出し、0.138を得た。

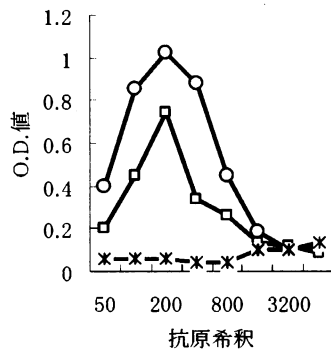


図-1a 陽性抗原に対する反応

○—強陽性血清 □—弱陽性血清

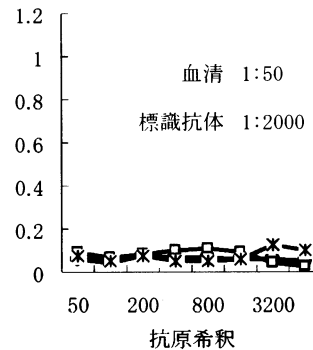


図-1b 陰性抗原に対する反応

—x—陰性血清

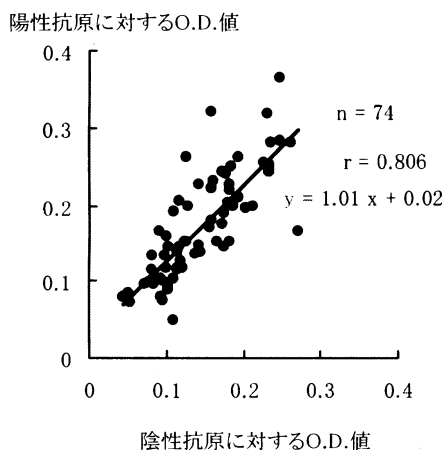


図-2 中和抗体陰性血清の陽性(y軸)及び陰性抗原(x軸)に対する反応

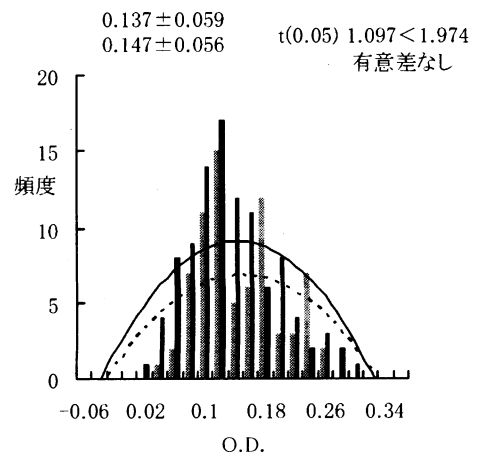


図-3 陰性抗原に対する中和抗体陽性及び陰性血清の反応

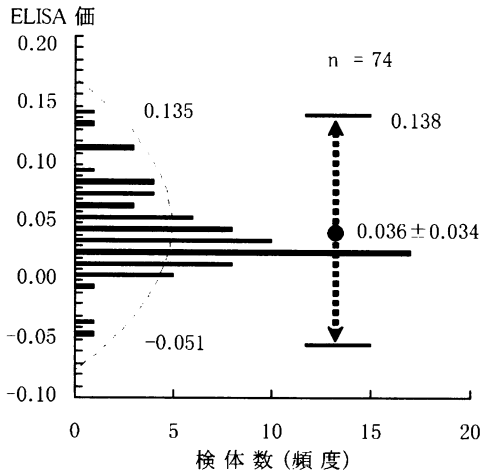


図-4 カットオフ値の設定

4) 中和試験法との比較

中和試験成績は、既報のRK13細胞を用いたブラック中和試験結果を引用した。

図-5は、50例の被検血清について、中和抗体価(x軸)とELISA抗体価(y軸)をプロットして相関を調べた結果である。相関係数 $r=0.876$ と高い相関が認められ、回帰式 $y=0.41x-0.23$ を得た。

中和抗体既知血清120例における中和抗体価陰性(4倍以下)及び陽性数とELISA抗体価陰性(カットオフ値0.138以下)及び陽性数の対比による一致率は、表-1のとおり89.2%(107/120)であった。なお、中和抗体からの陽性及び陰性検体の一致率は、夫々、95.5%(64/67)、81.1%(43/53)であった。

図-6は、種痘廃止後世代と種痘実施世代に分けて中和抗体価とELISA抗体価の一致状況を対比した成績である。種痘廃止後世代(1976年以降の出生)である28歳以下では、37例の全数が中和抗体価4倍未満、ELISA抗体価0.138以下を示し、陰性で一致した。一方、28歳以上の種痘実施世代における陰性例は中和法で19.3%(16/83)、ELISA法で10.8%(9/83)であった。また、小児の初種痘で得られるとされる平均中和抗体価32倍以上の高陽性抗体保有例は、26.5%(22/83)であり、この中和抗体価に相当する(前出の回帰式より算出)ELISA値0.795以上は、28.9%(24/83)であった。双方の測定法において、高率に高い抗体が保有されていることが覗かれた。

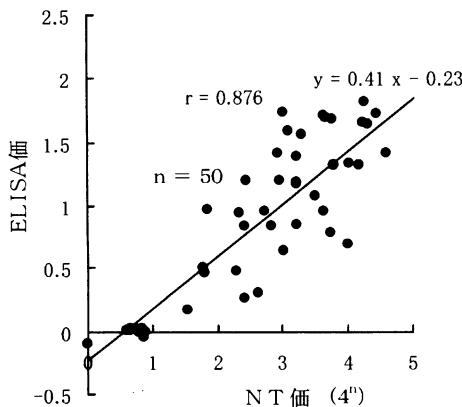


図-5 中和抗体価と ELISA 抗体価の相関

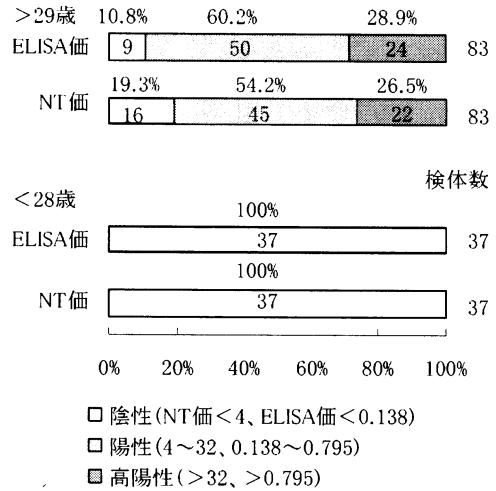


図-6 中和抗体価と ELISA 価の一致状況

表-1 中和抗体価とELISA抗体価の一致率

中和抗体価	ELISA抗体価	
	陽性検体数	陰性検体数
陽性検体数	64	3
陰性検体数	10	43

一致率 = 107 / 120 (89.2%)

IV 考察

ELISA法によるウイルス感染症の血清学的診断については、1970年代の半ば頃に実用化⁶⁾され、今日種々のウイルスにおいて一般化されて各種の診断用キットとして市販されている。しかし、ワクシニアウイルスの疫学解析等に関するELISA法の適用報告事例⁹⁾は非常に数少ない。これは、WHO天然痘根絶計画が1967年に開始され、1977年10月を最後に自然感染患者が根絶されたことが確認され、血清学的診断の意義がなくなった経緯とよく符合している。

牛の生体皮膚を用いた、従前の牛皮型痘瘡ワクチン種痘における有効性の簡便な判定には種痘部位の反応(善感)を指標として汎用されている。しかし、再(追加)種痘の場合には、種痘前の免疫状況に応じた局所反応を示し、一様ではないことが知られている³⁾。緊急時に使用が予定されている備蓄ワクチンの乾燥細胞培養痘そうワクチン「LC16・チバ」¹¹⁾は、1976年の予防接種法改正に際し、生後36から72ヶ月の間に一回だけ接種する方式として採用されたが、製造承認の直後に定期種痘が中止となり、一般的な使用は行われていない。臨床試験における小児への初種痘の善感反応については牛皮型ワクチンに比べて接種後の反応は3から4日遅れて10日目にピークがあるとされている⁷⁾。しかし、成人に使用する場合、特に抗体保有者への再(追加)種痘後の善感反応による有効性の判定には、不明な点が多い。備蓄ワクチン成人種痘による免疫獲得の有無は種痘後の局所反応の経日的観察と中和抗体価による血清学的な診断により、新たな判定基準と判定日の設定が必要と思われる。¹⁾

ワクシニアウイルスの血中抗体価の測定法であるブラック中和試験法は、感度、再現性、特異性において優れた方法である。しかし、手技が煩雑であり、結果の判定までに8日間と長時間を必要とする欠点がある。バイオ（天然痘）テロ等、今後危惧される緊急時におけるワクチン使用時の効率的な対応に関して、抗体価測定法等の適切な選択が求められる。

作出したELISA抗原は、細胞培養の225cm²プラスチック製カルチャーボトル当り、18,000検体分（1検体2穴使用として算定）処理可能な抗原量が容易に得られることから、抗原調製効率に優れたものである。反面、極めて簡単な処理により作出した粗精製なものであり、非特異反応が強く出現する可能性が危惧された。しかし、至適反応条件を選定し、陽性抗原の吸光度値から陰性抗原の吸光度値の差の値をELISA抗体価とすることで問題とはならなかった。ELISA抗体価のカットオフ値は、中和抗体陰性血清を用いて検討を加えた結果、低いレベル（0.138）に設定することができた。ブラック中和抗体価との対比において、高い一致率（89.2%）と高い相関（ $r=0.876$ ）が認められた。また、ELISA法は、種痘廃止後世代（1976年以降の出生）の全数が陰性で中和試験成績と一致したこと、種痘世代の陰性率が中和試験法に比べ低い値を示したこと等々から勘案し、特異性に問題はなく、感度において中和試験法よりも優れていると推察される成績が得られた。

更に、既報のブラック中和試験成績において、種痘後60~70余年以上経過している80歳以上の高齢者に高い抗体の保有が認められ、予想外の成績に疑問を呈する意見も示されていた。同一血清を用いたELISA法との対比において、中和試験成績の数値を確認、担保する成績が得られたことは天然痘の脅威に対する有効性を重視した旧予防接種法の適正さを改めて検証する結果となった。

以上の成績から、今回作出した抗原を用いたELISA反応系は、

種痘効果の判定、抗体保有状況等の大規模な疫学調査に簡便且つ迅速な作業効率の優れた検査方法として適用できることが示唆された。

《本研究の要旨は、第43回千葉県公衆衛生学会（平成17年2月24日開催）で発表した。》

参考文献

- 1) 橋爪壮：新しい弱毒株Lc16m8株の基礎。臨床とウイルス3：229-235, 1975
- 2) Henderson DA, et al: Smallpox as a Biological Weapon, Medical and Public Health Management. JAMA, 281: 2127-2137, 1999
- 3) 北村敬：痘瘡ワクチン（痘苗）。日本のワクチン 改訂2版：1-26, 1977
- 4) 窪谷弘子等：乾燥細胞培養痘そうワクチン「LC16・チバ」成人接種の評価。千葉県衛生研究所研究報告28：11-14, 2005
- 5) Lublin-Tennenbaum. T, et al: Correlation Between Cutaneous Reaction in Vaccinees Immunized Against Smallpox and Antibody Titer Determined by Plaque Neutralization Test and ELISA. Viral Immunology, 3: 19-25, 1990
- 6) Voller A, et al: Enzyme-Immunoassay for Antibodies in Measles, Cytomegalovirus Infections and after Rubella Vaccination. Br J Exp Path 57: 243-247, 1976
- 7) 山口正義等：種痘研究班研究報告書。臨床とウイルス3：269-279, 1975