

マイクロELISA法によるムンプス抗体測定

—特に抗体価の表示法について—

北山 秋雄¹⁾ 春日 邦子¹⁾ 十川 知子¹⁾ 内村真佐子¹⁾ 時枝 正吉¹⁾
市村 博¹⁾ 太田原美作雄¹⁾ 堀内 善信²⁾ 平山 宗宏³⁾

Micro-ELISA for the Detection of Mumps Virus Antibodies

—Aspect Related to Data Expression—

Akio KITAYAMA, Kuniko KASUGA, Tomoko TOGAWA
Masako UCHIMURA, Masayoshi TOKIEDA, Hiroshi ICHIMURA
Misao OHOTAWARA, Yoshinobu HORIUCHI and Munehiro HIRAYAMA

1. はじめに

マイクロプレートを用いた酵素免疫測定法（以下、マイクロELISA法と略す）は、迅速、簡便、高感度な測定法としてウイルス学的血清診断に広く実用化されている。しかし、測定で得られた吸光度は、抗原のロット、血清の前処理、反応条件（温度、Wellの位置）、マイクロプレートの種類、オートリーダーの性能等によって容易に変動する。そのため、既に各種感染症への適用にあたって術式の標準化が確立しているにも拘らず、測定された吸光度によって抗原量及び抗体価を表示する方法は、未だ統一化されていない。

我々は、生物定量法の中心的な分析方法である平行線定量法（Parallel line assay method）をムンプスの抗体測定に応用し、マイクロELISA法における抗体価表示の標準化を試みた。その結果、補体添加中和試験法に匹敵する良好な成績が得られたのでここに報告する。

2. 材料及び方法

1) 材料

(1) 抗原

抗原は、ムンプスウイルスEnders株感染ふ化鶏卵尿膜腔液を連続蔗糖密度勾配処理後、遠心沈澱して精製された抗原を国立予防衛生研究所（以下、予研と略す）か

ら分与を受けた¹⁾。

(2) 標準血清

標準血清は、ELISAで高い吸光度を示す免疫グロブリン製剤をプールし、ELISAで極めて低い吸光度を示したサル血清で希釈したものうち、ELISA単位が1,600単位（B血清）と800単位（C血清）の血清を予研から分与を受けた¹⁾。

(3) 被検血清

被検血清は、(1)1986年7月～9月に採取された、生後9ヶ月～10歳の小児血清28検体、及び(2)1985年度麻疹、風疹、ムンプス混合（MRM）ワクチン被接種者（1歳～2歳未満の小児血清）の接種前後の63ペア血清を用いた。

(4) マイクロプレート及び計測器

マイクロプレートは、Immulon I 平底プレート（Dynatech社）、ELISA計測器はMR580（Dynatech社）をそれぞれ用いた。

2) 方法

(1) マイクロELISA法

表1に示したように、坂田ら¹⁾の方法に準拠して行った。洗浄液は、0.01Mリン酸緩衝液-0.05%Tween20（pH7.4）、PBS/Tを用いた。希釈液は、0.1%ウシ血清アルブミンPBS/T（0.1%BSA-PBS/T）を用いた。尚、ヒト血清中に卵しょう尿由来抗原（CAF抗原）に対する抗体が存在し、ムンプスELISA抗体測定に影響を及ぼすという報告が幾つかある。^{2),3)}そこで、CAF抗原に対する抗体を取り除くため、0.01Mリン酸緩衝液で秀析したCAF抗原を25%、0.1%BSA-PBS/Tに添加し、これを用いて血清を100倍に希釈し、37℃1時間吸収を行った。

1) 千葉県衛生研究所

2) 千葉県血清研究所

3) 東京大学医学部母子保健学

(1987年9月30日受理)

表1 ムンプスELISA術式

| | |
|--------|--|
| 抗原吸着 | 精製抗原を炭酸緩衝液 (pH9.6) で希釈 100 μ /well 4 $^{\circ}$ C 1晩 |
| ↓ | |
| 洗浄 | PBS/T 3回 |
| ↓ | |
| 血清反応 | CAF抗原で吸収した標準血清, 被検血清を0.1%BSA-PBS/Tで二倍階段希釈 100 μ ℓ /well 室温 2時間 |
| ↓ | |
| 洗浄 | PBS/T 4回 |
| ↓ | |
| 酵素標識抗体 | ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGヤギ血清 (Cappel製) を0.1%BSA-PBS/Tで4,000倍に希釈 100 μ ℓ /well 室温 1時間 |
| ↓ | |
| 洗浄 | PBS/T 4回 |
| ↓ | |
| 酵素反応 | 0-フェニレンジアミン基質溶液 100 μ ℓ /well 暗所30分 |
| ↓ | |
| 反応低止 | 4N硫酸 25 μ ℓ /well |
| ↓ | |
| 吸光度測定 | OD492nm Dynatech MR580 |

(2) 補体添加中和抗体試験法

菱山らの方法に準拠して行った。なお、本試験は、武田薬品工業㈱で行われ、その検査成績を参照した。

(3) データ処理

平行線定量法による相対力価 (Relative potency : RP) の算出法⁹⁾。

① 血清反応

プレート毎に標準血清を配置する。標準血清と被検血清は、1 : 100から1 : 800まで2倍階段希釈を行い、1希釈3回繰り返し試験を行う。

② 計算の手順

以上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 (M343SX SORD㈱) を用いて独自の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) 標準血清の直線性の検定をする。
- C) 被検血清の直線性の検定をする。
- D) 2本の回帰直線の平行性の検定をする。
- E) 同一の吸光度における2本の回帰直線の距離(M)を計算する。
- F) 距離のantilog, 即ち相対力価を計算する。
- G) 相対力価の信頼区間を計算する。

3. 結果

表2は、1枚のマイクロプレートに被検血清3例を配

表2 本手法における相対力価の変動

| 検体番号 | 年齢 | 対数相対力価(M) | | | | 相対力価 (RP) の信頼区間 |
|------|----|--------------|--------|------|----------|-----------------|
| | | 範囲 | 平均 | 標準偏差 | 変動係数 (%) | |
| 309 | 7 | -.102~-.0129 | -.0483 | .042 | 8.7 | .856~.934 |
| 398 | 8 | -.819~-.723 | -.773 | .036 | 4.7 | .156~.182 |
| 436 | 4 | -.773~-.622 | -.702 | .064 | 9.1 | .173~.228 |

注. 1) C血清 (800単位) を標準血清として使用した。

2) 3被検体を6枚のマイクロプレートに一定に割り付けて測定し

置き、異なるマイクロプレート6枚を用いて繰り返し測定した結果である。対数相対力価の変動係数 (C.V) が最も大きい被検血清 (436) でも、C.V%=9.1であり再現性の良好な成績が得られた。

図1は、補体添加中和試験法と本手法を適用したマイクロELISA法により、ムンプスワクチン接種前と接種6~10週後の63ペア血清の抗体価測定を行い、中和抗体価と相対力価の相関を求めた散布図である。分散分析によって直線性の検定を行ったところ、 $F_L=1.29$ ($P>0.05$) で直線性が棄却されず、相関係数 (r) は、 $r=0.57$ を示した。通常、中和抗体価 2^2 以上が抗体陽性と見なされているので、用量反応回帰直線 $Y=0.337+0.129X$ に、 $X=2$ を代入して得られた相対力価は、 $Y=0.595$ であった。一方、ムンプスワクチン接種前の71被検血清は、補体添加中和試験法では何れも陰性で見なされていた。これらの相対力価の平均+3×標準偏差から求めた抗体陰性の上限の相対力価 (Cut off値) は、 $RP=0.23$ であった。

図2は、ムンプスワクチン接種前と接種6週後の38ペア血清について抗体価測定を行い、中和抗体価と相対力価の相関を求めた散布図である。そのうち、ムンプスワクチン接種後の38血清について分散分析によって直線性の検定を行ったところ、 $F_L=1.01$ ($P>0.05$) で直線性が棄却されず、相関係数 (r) は、 $r=0.609$ を示した。この用量反応回帰直線 $Y=0.331+0.117X$ に、 $X=2$ を代入すると、 Y (相対力価) =0.595が得られた。中和抗体陽性を基準として相対力価の抗体陽性の下限 (Cut off値) を定めるならば、この値以上がワクチン接種6週後の抗体陽性の下限と見なされる。また、ワクチン接種前38血清の相対力価の平均+3×標準偏差から求めた

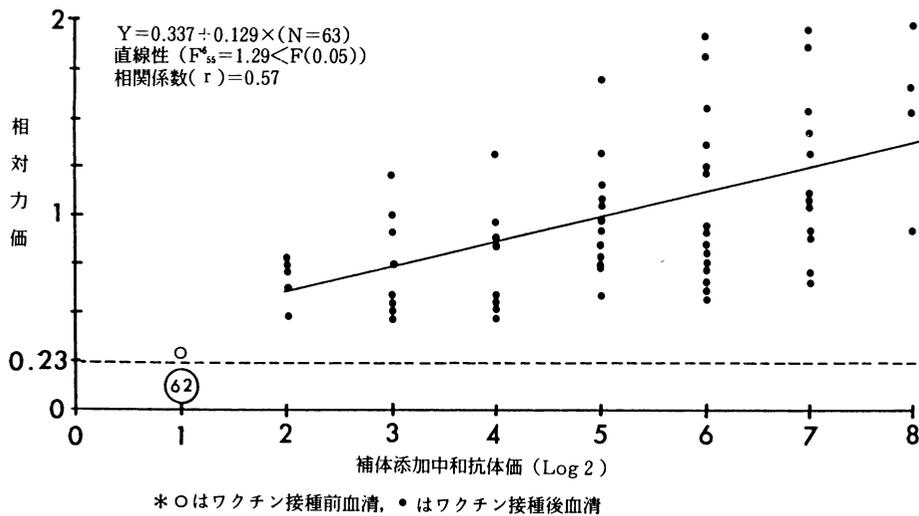


図1 相対力価と中和抗体価の相関図

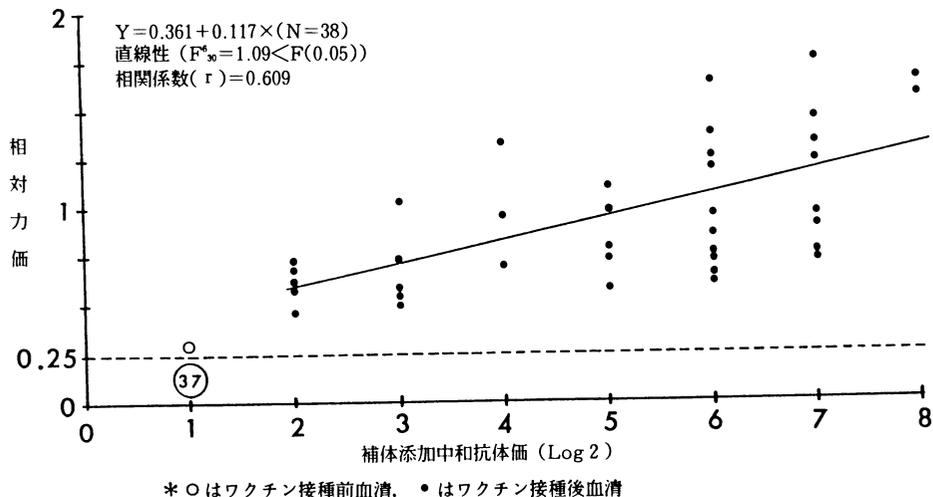


図2 相対力価と中和抗体価の相関図

抗体陰性の上限の相対力価は、 $RP=0.25$ であった。

なお、本手法で疑陽性にも拘らず、中和抗体価 2^2 以下の血清が63検体のうち1検体あったが、その理由については明かでない。

4. 考察

マイクロELISA法は、感度がよいだけに反応条件をコントロールするための配慮と対策が必要となる。既に、各種感染症で標準的な術式が確立されつつある。しかし、測定された吸光度によって、抗原量や抗体価を表示する方法は必ずしも十分に論議が尽されていない。De SavignyとVoller (1980)⁹⁾、Heck (1980)⁷⁾、Malvano

(1982)⁹⁾等は、吸光度から抗体価を読み取る方法について検討している。特に、Malvanoは、主な抗体表示法について比較検討している。特に、Malvanoは、主な抗体表示法について比較検討し、標準血清に対する相対的な力価によって表す方法が最も再現性がよいことを報告している。しかし、吸光度を真数で取り扱う等基本的な検討が十分なされていない。Melville Smith (1983)⁹⁾は、平行線定量法を用いて破傷風の抗体測定を試みているが、その推計学的取り扱いの基礎となる正規性、等分散性について具体的に記載していない。我々は、既に推計学的理論と手法に基づいて、マイクロELISA法における変動因子の定量的評価を試みるとともに、平行線定量法を応用することによって、これらの因子がコント

ロールされることを明らかにしている¹⁰⁾。

本研究は、その基礎的研究に基づき、特に、マイクロELISA法におけるムンプスの抗体価表示の標準化を目的に行ったものである。

表2は、相対力価の比較的低い被検血清について再現性の検討を行った結果を示している。これら3例については、いずれもワクチン接種歴や自然感染の有無についての情報がなく、その影響については明らかではないが、本法は、特に相対力価の比較的低い血清について再現性に優れていることが示唆された。

次に、本手法を用いてムンプスマイクロELISA法による抗体測定を行い、妥当性について検討を加えた。図1及び図2のように、本手法によって得られた相対力価は補体添加中和抗体価と直線性が認められる比較的高い相関を示した。抗体陽性の下限については、ワクチン接種後から採血までの経過週数に拘らず、相対力価の値が $RP=0.595$ であった。一方、抗体陰性の上限については、検体の違いによって若干の相違が見られたものの、誤差範囲内に収まる値が得られた。そこで、 $RP<0.25$ を抗体陰性、 $0.25<RP<0.595$ を疑陽性、 $0.595<RP$ を抗体陽性と見なした。

本研究においては、ウイルス粒子の各成分を抗原としているため、ELISA法によって測定される抗体価はムンプスウイルス粒子に含まれる各種抗原(エピトープ)に対する抗体の複合と考えられる。一方、ムンプス補体添加中和抗体は、ウイルス粒子の感染防御抗体とされている。それ故、両試験法によって測定された抗体価に相応の違いが生じると考えられるが、両抗体価の相関が高い値を示したことによって、本手法が補体添加中和試験法に匹敵し得る方法であることが示唆された。本手法は、相対力価が求められるためELISA単位に換算することが容易である。即ち、ELISA単位に変換することにより、同一術式における測定条件の違い(異なる施設、術者)による測定結果の比較が可能であるという利点がある。

5. まとめ

我々は、マイクロELISA法において平行線定量法を応用し、ムンプスの抗体価表示法の標準化について検討した。その結果、本法は、マイクロELISA法に由来する変動因子をコントロールし、補体添加中和試験法に匹敵する方法であることが示唆された。

稿を終えるにあたり、御指導御校閲を賜った千葉大学看護学部病態学講座橋爪壮教授、ムンプス精製抗原及び標準血清の供与につき御協力頂いた国立予防衛生研究所

杉浦昭部長、坂田宏子先生、資料を提供して頂いた武田薬品工業株式会社常務取締役長に深謝いたします。

文献

- 1) 坂田宏子, 山田章雄, 菱山美智子, 杉浦昭.(1984). Enzyme-linked immunosorbent as cut say (ELISA) によるムンプス抗体測定. 臨床とウイルス, 12, 81-86.
- 2) 坂田宏子, 菱山美智子, 杉浦昭.(1986). 卵の成分に対する抗体のムンプス IgG-ELISAへの影響. 臨床とウイルス, 14, 90-94.
- 3) 河島尚志.(1986). 酵素免疫吸着法(ELISA)用発育鶏卵培養精製ムンプス抗原に含まれる宿主由来抗原についての研究. 感染症学雑誌, 60, 257-266.
- 4) 菱山美智子, 伊藤康彦, 山田章雄, 鶴留雅人, 杉浦昭.(1984). ムンプスウイルスの補体添加中和試験に関する研究. 臨床とウイルス, 12, 74-80.
- 5) 黒川正身, 高橋宏一, 石田説而.(1978). バイオアッセイ生物定量法その医学生物学領域での適用. 近代出版.
- 6) De Savigny, D., and Voller, A.(1980). The communication of ELISA datem a from laboratory to clinician. J. Immunoassay, 1, 105-128.
- 7) Heck, F.C., Williams, J.D., and Pruett, J. (1980). Interpretation of spectro photometric assay. J.Clin. Microbiol., 11, 398-401.
- 8) Malvano, R., Bonioro, A., Dovis, M., and Zannino, M.(1982). ELISA for antibody measurement: Aspects related to data expression. J. Immunol. Method. 48, 51-60.
- 9) Melville-Smith, M.E., Seagroatt, V.E., and Watkins, J.T.(1983). A comparison of enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with the toxin neutralization test in mice as a method for the estimatiom of tetanusa-ntitoxin in human sera. J. Biol. Stand., 11, 137-144.
- 10) Kitayama, A., Uchimura, M., Horiuchi, Y. Study on factors of variation derived from micro-ELISA: application to parallel line assay method.(投稿予定). J. Biological Standardization.