

百日咳抗体測定キット(TH-100)を用いた抗体測定

内村眞佐子, 鶴岡 佳久

Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Bordetella pertussis*
Antitoxin by Using Beads Method

Masako Uchimura and Yoshihisa TSURUOKA

I はじめに

百日咳ワクチンの免疫効果は、百日咳菌感染の防御抗原でありワクチンの主成分である百日咳毒素(P T)及び繊維性血球凝集素(F H A)に対する血中抗体の有無で判定する。我々は、厚生省(及び千葉県衛生部)の伝染病流行予測調査事業の一環として、百日咳抗体保有状況調査を行っており、1983年から従来の百日咳菌抗凝集素価抗体の測定に加えて、抗P T及び抗F H A抗体価の測定を開始した。抗P T及び抗F H A抗体価の測定法としては、酵素抗体測定法(E L I S A法)が有用な方法として利用されている¹⁾。この測定法では、固層としてマイクロプレートを使用し、測定に先立って精製抗原でマイクロプレートの各ウェルを感作する方法がとられている。

従来E L I S A法は、実験室あるいは実験者間での測定値にばらつきがあるなど、問題点が指摘されている。我々はこれまでの研究で、抗体価の算出に平行線定量法を応用することによって、これらの問題がある程度改善される事を明らかにしてきた²⁾。しかしマイクロプレートを用いて抗体測定を行う限り、測定値には一定のばらつきが生じる³⁾。この原因として、ウェルの抗原感作が不均一であること、ウェルの洗浄が不十分であることなどが一般に考えられている。

最近、すでに抗原感作がなされているポリスチレンビーズを用いたE L I S A法(ビーズ法)が開発され、抗体測定用キットとして市販された⁴⁾。このE L I S A法キットは、洗浄操作を充分に行えるよう配慮されていると共に、すでに抗原感作がなされているポリスチレンビーズを用いることから、抗原感作段階での実験室間、実験間の誤差が生じにくいと考えられている。

我々は今後の流行予測事業に伴う百日咳抗体調査方法

を、従来のマイクロプレート法からビーズ法キットに代えるための基礎的な検討を行う目的で、マイクロプレート法及びビーズ法を用いて同じ血清の抗体価を測定し、得られた結果を比較検討した。

II 材料及び方法

1) E L I S A法

ボール法は、使用説明書の指示に従い、吸光度は、クオンタムII(ダイナボット社)で測定した。マイクロプレート法は、佐藤らの方法に準拠して行った¹⁾。炭酸ナトリウム緩衝液(0.156% Na_2CO_3 , 0.239% NaHCO_3)で $1\mu\text{g}/\text{ml}$ (P T)および $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$ (F H A)に調整した精製抗原を各々 $100\mu\text{l}$ ずつ平底イミュロン1マイクロプレート(ダイナテック社)の各ウェルに分注し、 4°C で一夜感作した。血清希釈およびマイクロプレートの洗浄には、0.05% Tween20混合リン酸緩衝生理食塩液(0.8% NaCl , 0.02% KH_2PO_4 , 0.29% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 0.02% KCl , 0.05% Tween20)を用いた。プレートの洗浄は各行程ごとに3回ずつ行った。標準血清及び被検血清の2倍段階希釈液は $50\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 、標準抗体(アルカリフォスファターゼ結合抗ヒトIgGヤギIgG, 5000倍希釈液)(タゴ社)は、 $100\mu\text{l}/\text{ウェル}$ を用い、反応はそれぞれ30分間行った。p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウムを基質溶解用緩衝液(9.7% ジエタノールアミン, 0.01% $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH9.8)で $1\text{mg}/\text{ml}$ に調整した基質溶液を、 $200\mu\text{l}/\text{ウェル}$ 分注し、室温で40分間反応後、マルチスキャンMCC/340(タイターテック社)で405nmにおける吸光度値を測定した。反応はすべて室温で行った。

2) 被検血清

0才から9才の健康児血清70検体を用いた。

3) 被検血清の抗体価の算出

プレート法は、国立予防衛生研究所から分与された標準血清J N I H10および被検血清を2倍段階希釈し、そ

千葉県衛生研究所

(1992年12月20日受理)

それぞれの希釈について2～4 ウェルを用いて測定を行い、得られた吸光度値から平行線定量法により、標準血清に対する相対力価を算出した²⁾。ビーズ法は、使用説明書の指示に従って行った。

III 結果

1) プレート法およびビーズ法で測定した標準血清の用量反応直線の比較

プレート法は標準血清200倍から2倍段階希釈し、その5段階について各希釈ごと4ウェルを用いて測定した。ビーズ法は、121倍から2倍段階希釈し、その10段階について各希釈ごと2個のビーズを用いて測定した。それぞれの測定値から、用量反応直線の直線性の検定及び回帰係数の算出を行った。PTを抗原とした場合、プレート法では400倍から3200倍(O.D. 0.8以下)で用量反応直線の直線性が成立し、直線の傾きは0.55であった。ビーズ法では、121倍から15500倍(O.D. 1.1～0.02)で直線性が成立し、直線の傾きは0.85であった(図1a)。

FHAを抗原とした場合、プレート法では200倍から3200倍(O.D. 1.0以下)で直線性が成立し、直線の傾きは0.51であった。ビーズ法では、121倍から15500倍(O.D. 1.5～約0.02)で直線性が成立し、直線の傾きは0.89であった(図1b)。

2) プレート法とビーズ法による測定値の比較

マイクロプレート法及びビーズ法による測定で得られた70検体の抗体価について、測定法間の相関性を検討した。PTを抗原とした場合、70検体中の42検体がビーズ法・プレート法共に1u/ml以上を示し、14検体が1u/ml以下を示した。ビーズ法で1u/ml以下であるがプレート法で1u/ml以上を示した検体、ビーズ法で1u/ml以上であるがプレート法で1u/ml以下を示した検体は共に7検体であった。これらの結果を散布図で示すと図2のごとく、両測定法による抗体価が2～3u/ml以上の検体では、ビーズ法による測定値がプレート法による測定値に比べて高い値を示し、ビーズ法で1u/ml以下の検体では反対にプレート法による測定値が高い値を示す傾向が認められた。FHAを抗原とした場合もPTとほぼ同様であった。

3) ビーズ法とプレート法で測定した年齢別抗体保有状況の比較

健康児血清70検体のビーズ法及びプレート法での測定結果を年齢別抗体保有率にまとめた(図3a, 3b)。ビーズ法及びプレート法のいずれの結果も、抗PT抗体保有率は0～2歳群で低く、3～5歳群で高くなり6～

9歳群で下がる傾向を示し、抗FHA抗体は年齢の増加に伴い、抗体価、抗体保有率共に高くなる傾向を示した。しかし、ビーズ法はプレート法に比べて、PT及びFHAのいずれの抗原に対しても、0～2歳年齢群で1u/ml以下の抗体価を示す検体の割合が多い結果を示した。

IV 考察

抗百日咳PT及びFHA抗体測定のためのビーズ法とプレート法は共に、バイオアッセイ法の平行線定量法に準じて、被検血清の抗体価を標準抗体に対する相対力価で表している。ELISA法は、検体中に含まれる抗体量を発色を伴う酵素基質反応の強さで表す方法で、実際には特定波長における吸光度値として測定される。吸光度分析法において、“吸光度値は溶液の濃度に比例する”というランバート・ベールの法則を応用すると、検体希釈濃度(対数値)における吸光度値(対数値)から算出される用量反応直線の傾きは1になる。ELISA法においても、理論的にはこの法則が当てはまるはずであるが、実際の測定では、測定に用いるオートリダーあるいは分光光度計の性能、またマイクロプレートを用いた場合は各ウェル間の測定値のばらつき、及び抗原感作から吸光度測定に至る操作に含まれる種々の因子等の影響を受け、用量反応直線の傾きは1より小さくなる傾向にある。従って用量反応直線の傾きを知ることは、測定系の評価の一つとして重要である。今回の測定で、ビーズ法で測定した標準血清の用量反応直線の傾きはPTでは0.85、FHAでは0.89とプレート法に比べて値が大きく、理論値により近いことがわかった。用量反応直線の傾きが小さくなるのは、抗体濃度が薄い検体での吸光度値が真の値より高く、抗体濃度が濃い検体での吸光度値が真の値に比べ低くなるからである。その原因として、1)被検血清が固層へ非特異的に吸着するか又は固層の洗浄が不十分のため、低い抗体価の検体で見かけ上高い吸光度値を示す、2)オートリダーの性能上吸光度値の読みとりに限度があり、高い抗体価の検体で見かけ上低い吸光度値を示す等の理由が考えられる。ビーズ法は、24ウェルプレートあるいは試験管にポリスチレンビーズを入れ抗原抗体反応及び洗浄を行い、酵素基質反応は別の試験管に移して行うことから、同じウェル内で抗原抗体反応及び酵素基質反応を行うマイクロプレート法に比べ、非特異的な発色が少ないと思われる。また、試験管をセルとして用いるクオラムIIによる測定は、マイクロプレートオートリダー(マルチスキャンMMC/340)による測定に比べ高い吸光度値まで正確に測定できた。

感染症に関わる抗体検査法でもっとも重要なことは、感染初期の抗体の動きを正確にとらえること、つまり低い抗体価を正確に測定できる事である。ビーズ法で得られた測定値はマイクロプレート法による測定値に比べて、ワクチン接種開始前の年齢である0~2歳の抗体価の多くが 0.5 u/ml 以下で、抗体価陰性であった。ビーズ法で測定することにより抗体陰性と陽性を明確に知ることができ、正確な百日咳抗PT及び抗FHA抗体価調査が可能となった。

V 文献

1) Sato, H., and Y.Sato. : *Bordetella pertussis* infection against two antigens, pertussis toxin, and filamentous hemagglutinin with mouse protectivity in an intracerebral or aerosol challenge system. *Infect. Immun.*,

46 : 415 -421, 1984.

2) 内村真佐子, 北山秋雄, 堀内善信, 太田原美作雄 : 平行線定量法 (Parallel line assay) を用いた ELISA法 (酵素抗体法) による百日咳抗体測定。臨床と微生物, 16 : 205-210, 1989.

3) 内村真佐子, 矢崎広久, 北山秋雄, 堀内善信 : ELISA法による抗体測定に用いるマイクロプレートの種類の検討。千葉衛研報告, 13, 17-20, 1989.

4) Sato, Y., H.Sato, H.Kodama, M.Uchimura, N.miwa, T.Kobayashi, E.Yamamoto, I.Fujita, and T.Kumamoto : An improved ELISA system for the measurement of IgG antibodies against pertussis toxin (PT) and filamentous hemagglutinin (FHA) in human sera. *Develop. bio. Standard.*, 73, 167-174, 1991.

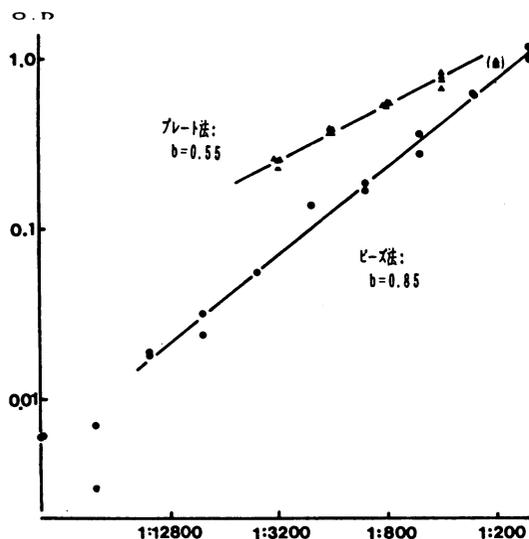


Fig. 1 a 標匠血清JNIH10の用量反応白線 (PT)

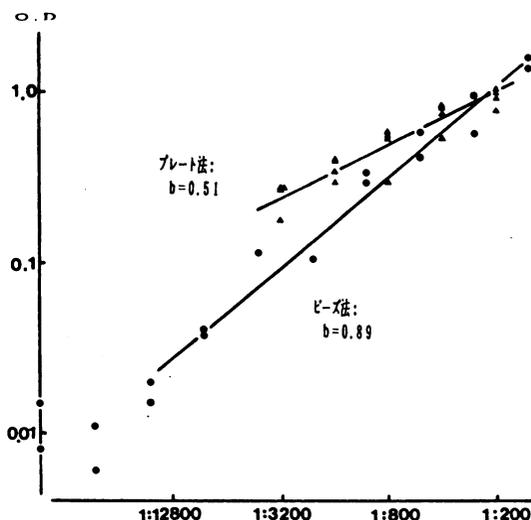


Fig. 1 b 標準血清JNIH10の用量反応直線 (FHA)

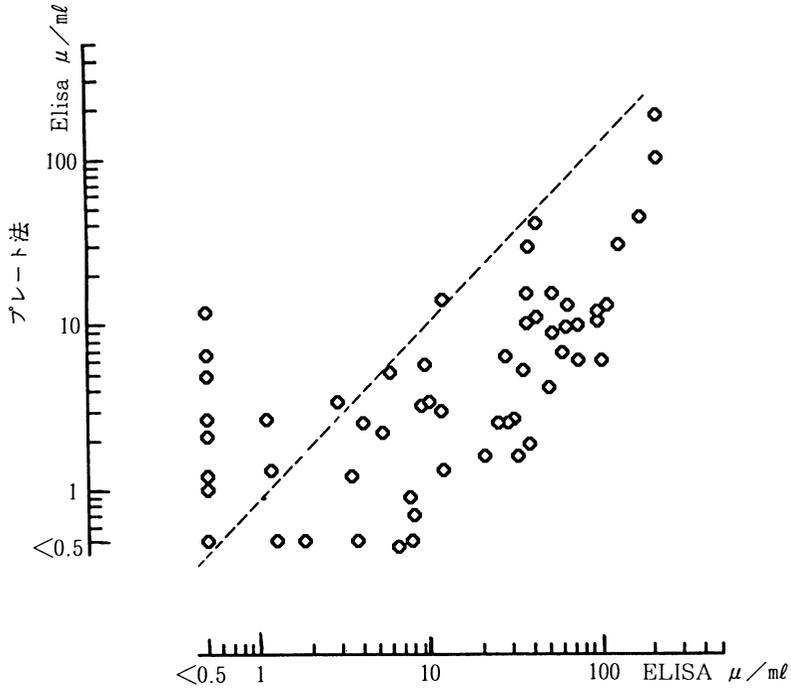


Fig. 2 ビーズ法とプレート法で測定した抗体価の比較

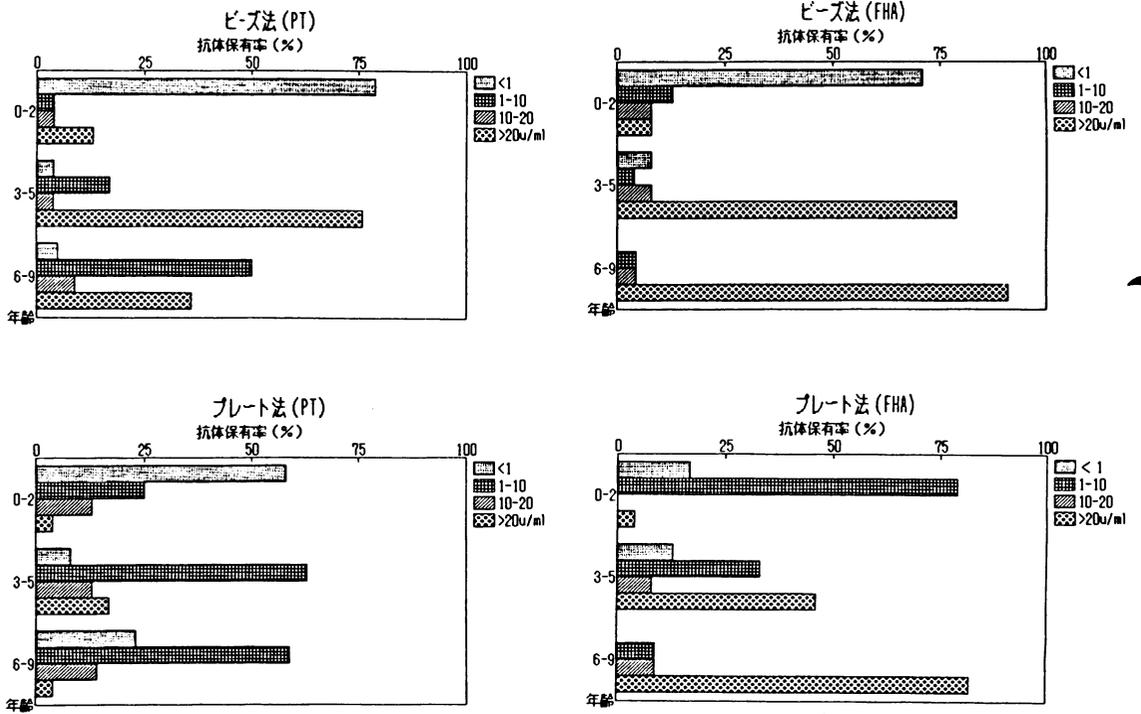


Fig. 3 a ビーズ法及びプレート法による測定からみた年齢群別PT抗体保有状況

Fig. 3 b ビーズ法及びプレート法による測定からみた年齢群別抗FHA抗体保有状況