

験 (PA) キット(富士レビオ)、風疹：HI、インフルエンザ：HI、ジフテリア：中和、百日咳：酵素免疫吸着法 (ELISA) キット (武田薬品)、破傷風：PA キット (化血研)。麻疹では以前は HI が使われていたが、ミドリザル赤血球の入手が困難になり、麻疹 PA キットの製造をメーカーに依頼した、という経緯がある。上記標準法では百日咳 ELISA を除き、すべて血清の 2 倍階段希釈を行い反応終末点を求める方法である。

## 2. 血清診断のための測定法

感染症の病原診断は病原体を検出するのが本道であるが、ウイルスの場合は光学顕微鏡でも見えない、分離培養が難しい、等のことから、血中の抗体を測定して診断する方法で代用することが多い。診断のやり方は、①ペア血清で抗体価の上昇を検出、②単一血清で IgM 抗体を検出、することが主である。この血清診断法で注意すべきことは、抗体は病原体が患者に残して行った足跡であって、抗体の存在が病原体の存在を示すわけではなく、また抗体価に病態を表す基準値はないことである。

この目的のための抗体測定法は、血清疫学調査のためのものと必ずしも同じではない。測定結果が迅速に得られるものが望まれるため、中和試験はあまり使われない。昔からの補体結合試験(CF)、HI などのほかに、ELISA キットが使われることが多い。最近はさらに遺伝子工学技術で大量のウイルス蛋白を作ることができるようになったので、それを使った免疫クロマト法や PA 法のキットも出てきた。

ウイルス抗体の絶対量を測定することは不可能である。血清中の抗体は、一つの抗原エピトープに対するものでも、多数の B 細胞クローンから産生された、親和性の異なる抗体の集合である。さらに、一つの抗原蛋白には多数のエピトープがあり、また、一つのウイルスには多数の抗原蛋白がある。したがって、標準抗体測定法を決めても、絶対量のわかった抗体標準品を調製することはできない。特に ELISA では標準法は無く、異なったメーカーは異なった方式のキットを作る。キットには参照血清が入っているが、これはヒト血清しか使えない。抗体標準品が無いので、異なったキット間で相互に結果を比較するためのヒト参照血清を調製することもできないのである。

抗体測定から病原体を推測することにはもともと不確実性が付きまとい、血清診断には限界があることを留意しておく必要がある。異なった原理の抗体測定法を組み合わせる総合的な推測診断をする必要もある。

## II. 研究会での演題と討論

研究会では以下の 11 演題が発表された。

- 1) ジフテリア抗体測定法
- 2) 破傷風抗体測定法
- 3) 百日咳抗体測定法
- 4) ELISA によるポリオウイルス抗体測定法
- 5) ムンプスウイルス抗体測定法としての補体添加中和法と Beads 法の比較

- 6) 組換え型 E1 蛋白質を抗原とする抗風疹ウイルス IgM 抗体簡易検出試薬の開発
- 7) 麻疹 PA キットを用いた IgM 抗体測定法の開発
- 8) 麻疹 EPI に対応したウイルス中和抗体測定法の確立
- 9) 継代培養細胞を用いた日本脳炎中和抗体測定法：CE 細胞法との比較
- 10) セラミックビーズを用いた新しい日本脳炎抗体測定法の開発
- 11) ウイルス検査技術連絡会の活動について

上記演題 1) 2) 3) は、現行の感染症流行予測調査事業で使われている DPT 抗体測定法を解説したものである。長年の経験の中からこれらの方法が選択され、それを使って地研で抗体測定が行われ、日本人の DPT ワクチン接種の結果がモニターされていることを、臨床家の方が知っていただけたら幸いである。抗体調査の結果は、感染症情報センターのホームページ(<http://idsc.nih.go.jp/>)の【免疫状況】欄および『病原微生物検出情報』月報の各疾患の特集号を参照されたい。

4) ポリオウイルス型特異抗体を測定するには、従来中和試験だけしか無かったが、培養細胞を使わないで型特異抗体を測定する試みである。型特異モノクロン抗体を使った ELISA 抑制法を応用した。

5) ムンプスウイルス抗体測定には従来 HI が使われているが、感度が低いという問題がある。補体添加中和法は感度・特異性も高いが、多数の血清を扱う疫学調査には適さない。今後ムンプスワクチン接種を再開するかどうかの判断には、国民の免疫状況を知るための血清疫学調査が必要である。予防接種法で定期接種になっていない疾患(ムンプス、水痘、A 型肝炎など)の血清疫学調査に免疫粘着赤血球凝集試験(IAHA)が使えるのではないかと、という意見が出された。

5) もう一つの発表のビーズ法は今までになかった新しい方法である。抗原を吸着させた V プレートに血清を反応させ、プレート洗浄後、抗ヒト IgG 結合ビーズを加える。抗体があればビーズは穴底斜面にとどまって一層のビーズの膜が生ずる。抗体が無ければ、ビーズは穴底中心に沈む。間接法 ELISA での酵素結合抗ヒト IgG の代わりにビーズ結合抗ヒト IgG を使った、とも考えられる。ELISA では抗原に非特異的に吸着した IgG があっても陽性反応が出る。しかしビーズ法では、非特異 IgG はビーズの重さのためにはがれて、反応は陰性になり、特異性が高くなる可能性がある。今後さらなる検討が行われるだろう。

6) 風疹免疫クロマト法は、IgM 抗体を短時間(10分)で検出するという方法である。将来の WHO 麻疹根絶事業で、麻疹と風疹とを鑑別するのに役立つかもしれない。

7) 簡便に麻疹 IgM 抗体を検出する方法である。U プレート穴底斜面上の IgM 抗体が麻疹抗原結合ゼラチン粒子を捕捉し、穴底斜面上にできた粒子の膜を肉眼で確認する。WHO 麻疹根絶事業で採用された。

8) 麻疹ウイルス中和抗体測定には今まで適当な培養細胞が無かったが、小船が確立した B95a 細胞を使って中和試験を行う手順を完成させた。

9) 感染症流行予測事業では日本脳炎抗体測定にニワトリ胚初代細胞(CE)を使ってき

たが、いくつかの問題点があった。この中和法を簡便に行うために Vero 細胞を使う方法を確立した。

10) は日本脳炎 IgM 抗体を測定する方法で、原理は 7) と同じである。ゼラチン粒子の代わりにセラミック粒子を使う。

11) 民間検査センターと試薬メーカーからなる「ウイルス検査技術連絡会」は、血清希釈をして終末点を抗体価とするウイルス抗体測定法 (CF, HI, FA) で施設間差をなくす努力をしてきている。検査手技の統一と参照血清の使用により、コントロール血清の抗体価は中心値から ± 1 管以内に収まるようになっている。しかし ELISA の結果は、各検査センターで同じメーカーのものを使うわけではないので、比較をすることは不可能である。

この研究会には、臨床家、微生物研究者、ワクチン・試薬メーカー、検査センターなどの異なった分野の人が 70 人以上も集まり、予防接種疾患の抗体測定に関し異なった視点からの情報交換を活発に行うことができた。この研究会の内容は、予防接種研究班総会に集まる全国の予防接種関係者に伝え、この報告書に記録として残すことになった。

以下には上記 11 演題の要約を掲載する。原稿を提出していただいた方々、研究会に出席された方々に深く感謝する。

## ジフテリア抗体測定法

小宮 貴子、福田 靖、岩城 正昭（国立感染症研究所 細菌・血液製剤部）

大隈 邦夫、高橋 元秀（化学及血清療法研究所）

ジフテリアの抗体価測定法には、主に次の方法があります。

### 1. *in vivo*法

- (1) モルモット皮下接種法（壊死、致死毒素活性を指標とした中和抗体価）
- (2) ウサギ皮内接種法（発赤、壊死毒素活性を指標とした中和抗体価）

### 2. *in vitro*法

- (1) 培養細胞法 （細胞毒性を指標とした中和抗体価）
- (2) ELISA法 （結合抗体価）
- (3) PHA法、KPA法（間接赤血球凝集又はポリアミノ酸粒子の凝集を指標とした結合抗体価）

ジフテリア抗体価測定の主な目的は、血清中の毒素中和抗体価を定量することにより、トキソイドワクチンの有効性を知ることと、ジフテリア感染の状況を把握することにあります。定量法の歴史的な流れとして、血清中の中和抗体価を測定するモルモット法、ウサギ法が標準測定法として用いられてきました。

しかし、動物実験に際しては、動物の収容施設や経験を持つ管理者等が必要です。これら*in vivo*法の欠点を補いつつ*in vitro*法へ発展させることを目的に検討が行われ、1970年代に中和抗体価が測定できる系でもあるVERO細胞を用いた培養細胞法が導入されました。得られた成績を解析した結果、他の*in vitro*法に比べて再現性と精度についても優れていることが確認され、現在この試験法は広く各国で採用されています。

他の*in vitro*法の中で、ELISA法は、標準ヒト抗体（標準血清）が用意されていないこと、中和抗体価との相関が十分ではないこと等の理由により、ワクチン接種後の抗体調査には採用されていません。

PHA法は調製した感作赤血球の品質のバラツキによる再現性が低いという欠点があり、この問題を克服するため、ポリアミノ酸粒子を用いたKPAキットが試作されました。PHA法と同様な測定成績が得られたものの、測定する血清によっては無視できない非特異反応が生じることが検討課題となっています。

以上のことから、現在は、培養細胞法がジフテリア抗体価測定の標準法として用いられています。しかし、この方法も、細胞の維持管理などの技術や、判定等の経験を必要とします。今後も細胞培養法における判定の自動化や、更に中和抗体価を迅速、容易に定量する方法の開発が望まれています。

## 破傷風抗体測定法

福田 靖、岩城 正昭、小宮 貴子（国立感染症研究所 細菌・血液製剤部）

大隈 邦夫、高橋 元秀（化学及血清療法研究所）

現在 主に破傷風抗体価の測定方法には、*in vivo*法としてモルモット・マウスなどの実験動物を用いた破傷風毒素中和試験、*in vitro*法として、ホルマリン処理赤血球やポリアミノ酸粒子を用いる凝集反応試験とELISA法がある。

### 1. *in vivo*法

実験動物を用いた方法（毒素による致死、麻痺を指標とした中和抗体価）

### 2. *in vitro*法

#### (1) PHA法又はKPA法などの凝集反応試験

（間接赤血球凝集又はポリアミノ酸粒子の凝集を指標とした結合抗体価）

#### (2) ELISA法（結合抗体価）

これらの試験法には長所・短所があるが、*in vivo*法の毒素中和試験は、破傷風の発症防御に重要な防御（中和）抗体価を測定できる反面、動物が必要であり、判定に1週間を要するため、簡便な試験法とは言い難い。一方で、これらの短所を克服するために開発された凝集反応試験やELISA法などの*in vitro*法は、抗原として用いたトキシイドに対する結合抗体価を測定するために、抗体の中和活性を必ずしも正確に測定できる試験系ではありません。その反面、短時間で判定可能であり、検出感度も*in vivo*法である毒素中和試験より高いという利点がある。*in vitro*法のうちKPA法（化血研）は、PHA法の改良法であり、ホルマリン処理赤血球の代わりにポリアミノ酸粒子を利用し、PHA法に比較して再現性が高く、市販品なので入手が容易である。また、その測定抗体価と動物を用いて測定した中和抗体価との間にも十分な相関が認められている。ELISA法は、測定機器が整っている施設では広く実施されているが、標準試験法が確立されていない事から、検査機関間の試験結果を相互に比較する事ができない点など、解決すべき問題が多い。

現時点では、中和抗体測定法では無いが、大量の検体を迅速に試験するのに適したKPA法が、国内の破傷風抗体価の標準測定法として採用され、厚生労働省で実施されている感染症流行予測事業でも利用されている。

破傷風の予防には破傷風トキシイドの接種による防御抗体の獲得が必要である事などから、個人レベルでの破傷風抗体保有状況の把握が重要である。また、破傷風の効果的な治療には早期診断が必須であり、臨床の現場でも患者血清中の抗体価が測定されている。これらの事から、今後はさらに簡便、迅速、そして中和抗体価を測定可能な試験方法の開発が望まれる。

## 感染症流行予測事業で使用されている百日咳 BALL-ELISA キットについて

近田 俊文（国立感染症研究所 細菌・血液製剤部）

松永 泰子（国立感染症研究所 感染症情報センター）

【背景及び目的】感染症（伝染病）流行予測調査事業における百日咳の感受性調査は、現在、人血清中の抗百日咳毒素（抗 PT）及び抗繊維状赤血球凝集素（抗 FHA）抗体（IgG）価を酵素免疫測定法（ELISA 法）で測定している。これは 1981 年にわが国が世界に先駆けて開発導入した沈降精製百日咳ワクチン（無細胞百日咳ワクチン）の主防御抗原が無毒化した PT と FHA になったため、そのワクチンの接種効果を評価するために開発された方法である。流行予測事業における抗体価の測定は、市販 96 穴 ELISA プレートに精製抗原をコーティングする通常の PLATE-ELISA 法を、標準的な検査術式に定めて 1983 年度から導入された。この PLATE-ELISA 法は 1990 年度の調査まで用いられ一定の成果を上げたが、器材、試薬及び手技の細かいところまで統一するのは困難であった。その結果、各施設間の測定誤差が大きく、特に十数単位/ml 以下の低抗体価の検体で顕著なバラツキが見られることが指摘されてきた。この PLATE-ELISA 法に比べて、感度、特異性及び再現性に優れ、低抗体価の検体においても安定した測定成績が得られる、精製抗原をコーティングしたポリスチレンボールを用いる PS-ball ELISA 法が開発された<sup>1, 2)</sup>。この方法は 1992 年にキット化されて体外診断用医薬品・百日咳菌抗体価測定試薬「タケダ」（BALL-ELISA キット、製造元：武田薬品工業、発売元：和光純薬工業）として市販された。1991 年度にこの市販キットの試作品（TH-100：武田薬品工業）を用いて、各施設（地方衛生研究所）に対する講習会並びに確認評価のための比較試験（1990 年度の検体を使用）を 1991 年度衛生微生物技術協議会・レファレンス委員会で実施した。その結果、PLATE-ELISA 法よりも BALL-ELISA キット法の測定成績の方が、各施設間でのバラツキが少なく、再現性や信頼性が高いことが認められ、かつ、操作が簡便で標準化が容易であることが確認された<sup>3)</sup>。したがって、流行予測事業では 1994 年度の百日咳の感受性調査から正式に BALL-ELISA キット法を採用して実施されることになった<sup>4)</sup>。本研究では BALL-ELISA キット法の特徴などを紹介するとともに、流行予測事業などにおける百日咳の抗体保有状況について年齢別及び年度別の調査結果<sup>4, 5, 6)</sup>を紹介報告する。

【方法】第 1 回抗体測定法研究会（厚生省予防接種研究班・抗体測定法研究会（世話人）井上栄：2001 年 1 月 17 日、国立感染症研究所、東京）において、本研究の内容及び資料を抄録と OHP を用いて口頭発表した。

【結果】百日咳菌抗体価測定試薬（BALL-ELISA）キットの本質（構成）、標準液の

調製法、必要な器具・器材、測定操作法、検量線、共存物質の影響をキットのパンフレット<sup>7)</sup>及び付属説明書<sup>8)</sup>の資料などを用いて解説するとともに、文献1、2の図と表を引用してこのキットの信頼性についての説明を行った。また、わが国における百日咳の年齢別及び年度別の抗体保有状況について、文献4、5、6の図を引用して説明を行った。

【考案】流行予測事業で正式採用している百日咳 BALL-ELISA キットは、百日咳抗体価測定において各施設間でのバラツキが少なく、感度、特異性、再現性に優れ、低抗体価の検体においても安定した測定成績が得られる方法であり、百日咳の血清疫学調査などの測定法として利便性があり非常に有用と考えられる。

#### 【文献】

- 1) Sato, Y., *et al.*: *Develop. biol. Standard.*, 73, 167-173, 1991.
- 2) Kuno-Sakai, H., *et al.*: *Vaccine*, 10, 350-352, 1992.
- 3) 宮村紀久子：平成3年度伝染病流行予測調査報告書, 127-137, 1993.
- 4) 近田俊文・松永泰子：平成6年度伝染病流行予測調査報告書, 112-131, 1996.
- 5) 近田俊文・松永泰子：平成7年度伝染病流行予測調査報告書, 69-90, 1997.
- 6) 近田俊文 他：小児科, 41, 1495-1503, 2000.
- 7) 百日咳菌抗体価測定試薬「タケダ」, パンフレット, 1992.
- 8) 百日咳菌抗体価測定試薬「タケダ」, 付属説明書, 1992, 1994 改訂.

## ELISA による抗ポリオウイルス抗体測定法

宮沢美和子、堀江 均、安部 忍、土居 穰、橋爪 壮（日本ポリオ研究所）  
橋戸 円（国立感染症研究所）

### 【目的】

不活化ポリオワクチン(IPV)の有効性を調べる最も重要な試験として、IPVで免疫したラット血清中の抗ポリオウイルス中和抗体価測定試験がある。この試験は、従来培養細胞による中和法で行っているが、結果の判定までに1週間程度は必要であり、また無菌操作や細胞培養など煩雑な操作を必要とするため、一度に多数の検体を扱うことが困難である。今回、橋戸らによる抑制ELISAを一部改変して、IPVの有効性試験に多数使用するラット血清中の抗ポリオウイルス抗体価の簡便な測定系の開発を試みた。

### 【方法】

ELISAは、まず各型ポリオウイルス（Sabin 1, 2型は $10^8$ , 3型は $10^{7.5}$  CCID<sub>50</sub>/mL）と3倍階段希釈した被検血清を96穴マイクロプレート上で等量混合し、36°Cで3時間加温後4°Cで一晩静置した。次に、このウイルス-血清混合液を型特異的な各型抗ポリオウイルス単クローン抗体をコートしたELISA用プレートに移し、36°C 2時間反応させた後、抗ポリオウイルスウサギ血清、HRPO標識抗ウサギIgG抗体を反応させ、発色後492 nmの吸光度を測定した。被検血清の代わりに希釈液を使用した場合の吸光度を100%とした時の、50%の吸光度を示す被検血清の希釈倍率を抗体価として算出した。被検血清として、IPVを接種したラット血清104例及び生ポリオワクチンを接種したヒトの血清53例を使用した。また、培養細胞による中和法はHEp-2C細胞を用いたマイクロ法で行った。

### 【結果】

ラット血清及びヒト血清での、ELISAによる抗体価と培養細胞による中和法で得られた抗体価を図1に示した。ELISAでの抗体価が中和法による抗体価と比較して若干低い値を示した血清が、ラットにおいて数例見られたが、ラット、ヒト血清共に、ELISAによる抗体価と中和法で得られた抗体価との間に高い相関性が見られた。

### 【考察】

ラットにおいて数例見られたELISAでの抗体価が、中和法による抗体価より低く出てしまうという問題を解決するため、現在ELISA用プレートにコートする抗ポリオウイルス単クローン抗体及び二次抗体として使用するウサギ抗血清について、他の数種類の抗体（抗血清）を含めて、希釈倍数や反応条件等の詳細な検討を行っている。また、本試験では被検血清との反応に生ポリオウイルスを使用しているが、生ウイルスの扱いには多くの制約を受けるため、ホルマリンで不活化したポリオウイルスを使用する系の構築も検討している。

ここで報告したELISAが、ラットによるIPVの有効性試験だけではなく、ポリオサーベイランスの際に大量に得られるヒト血清の抗ポリオウイルス中和抗体価測定にも有効利用できるものと期待される。



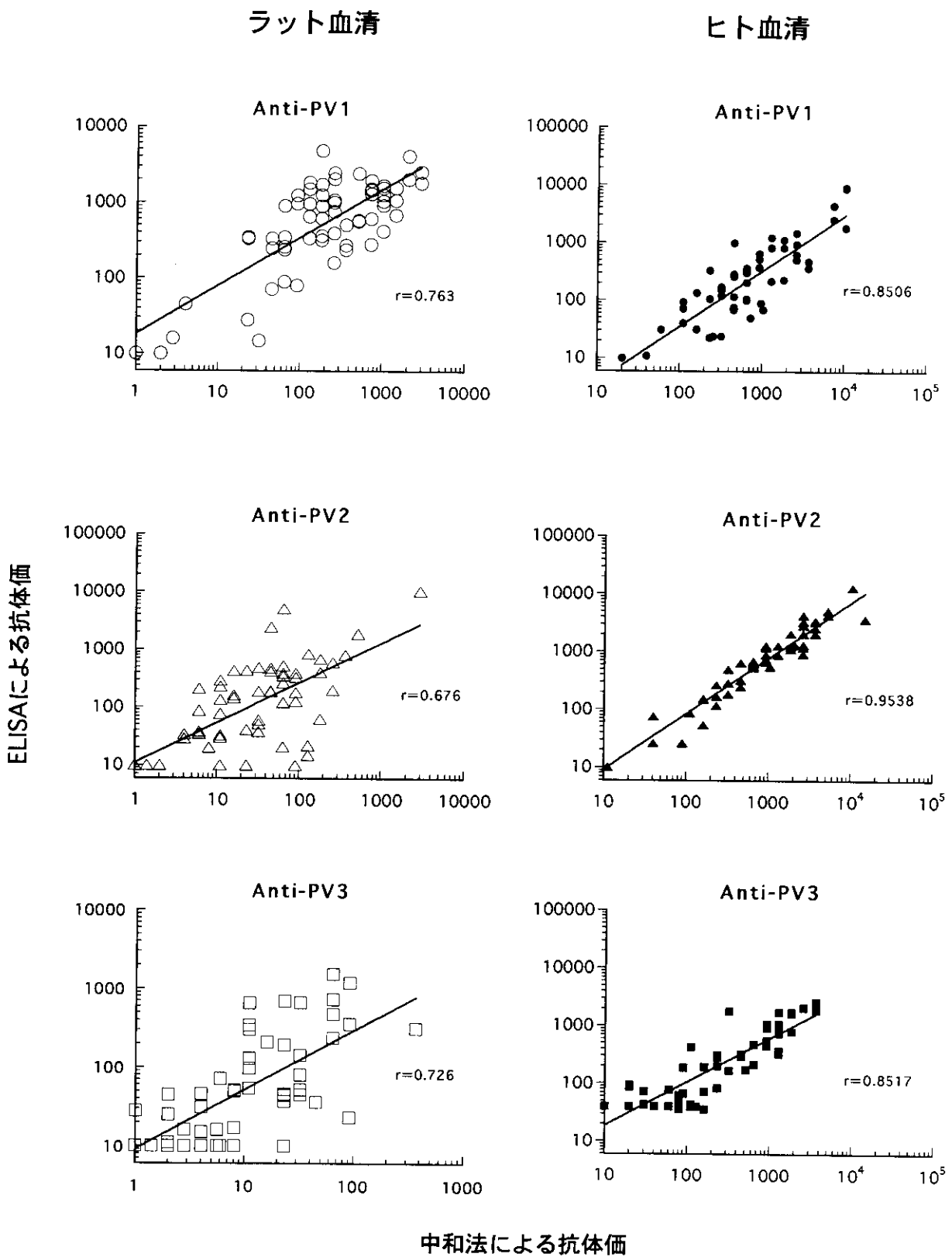


図1 ラット及びヒト血清のELISAによる抗体価と中和法による抗体価

## ムンプスウイルス抗体測定法としての補体添加中和法と Beads 法の比較

○菱山美智子、小浜 友昭、海野 幸子、田代 真人（国立感染症研究所 ウイルス製剤部）

黒澤 八重、山本 晃（旭光学工業株式会社、ニューセラミックス事業部）

[目的] 補体添加中和抗体測定法は、感度と特異性は高いが、操作が煩雑で多数の検体に対応できないため疫学調査に適さない。そこでこれに代わる簡便な抗体測定を求めて、セラミックビーズ凝集法（Beads 法）について検討した。

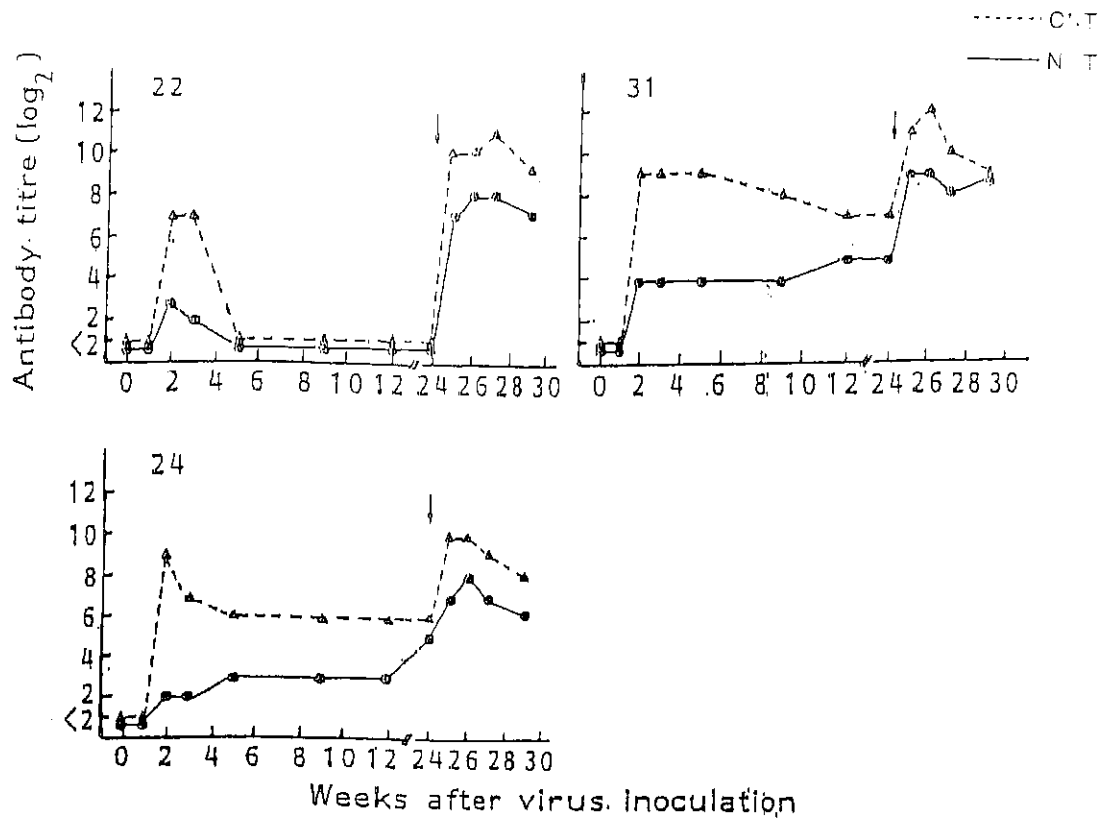
[材料と方法] 補体添加中和法：Vero 細胞を 24 穴プレート(Linbro)にまき、2 日間培養した。  
抗血清の 4 倍希釈系列に、ムンプスウイルスと補体を加え、37℃で 2 時間反応させた。  
これを細胞に接種して、4 日後にプラークカウントして、50%プラーク減少を測定した。  
Beads 法：96 穴 V プレートにムンプスウイルスの精製抗原をコートし、被検血清の 2 倍  
階段希釈液を加え室温で 30 分反応後、抗ヒト IgG 固定化セラミックビーズを加えて室温で  
60 分静置後凝集像を見て判定した。

[結果] 補体添加中和法に用いる血清については、抗補体作用除去のための血清非働化の条件を検討した。  
その結果、通常の 56℃、30 分ではプロゾーンが残るが、64℃、20 分にすると良好な結果が得られた。  
また補体添加中和抗体価は感染初期に高いので、一時点のサンプルでも補体無添加の通常法との差が  
 $2^3$ 以上あれば、感染初期であると推測することができる。(図 1) 補体添加中和法と ELISA について、  
ワクチン接種後の take (善感) 率を比べると、いずれもほぼ 90%であり、両者の結果は一致していた。  
Beads 法は、検討を始めたばかりであるが、ワクチン接種前後のサル血清の抗体価について測定  
した後に、補体添加中和法と比べたところ、相関係数は  $r=0.92$  であった。(図 2)

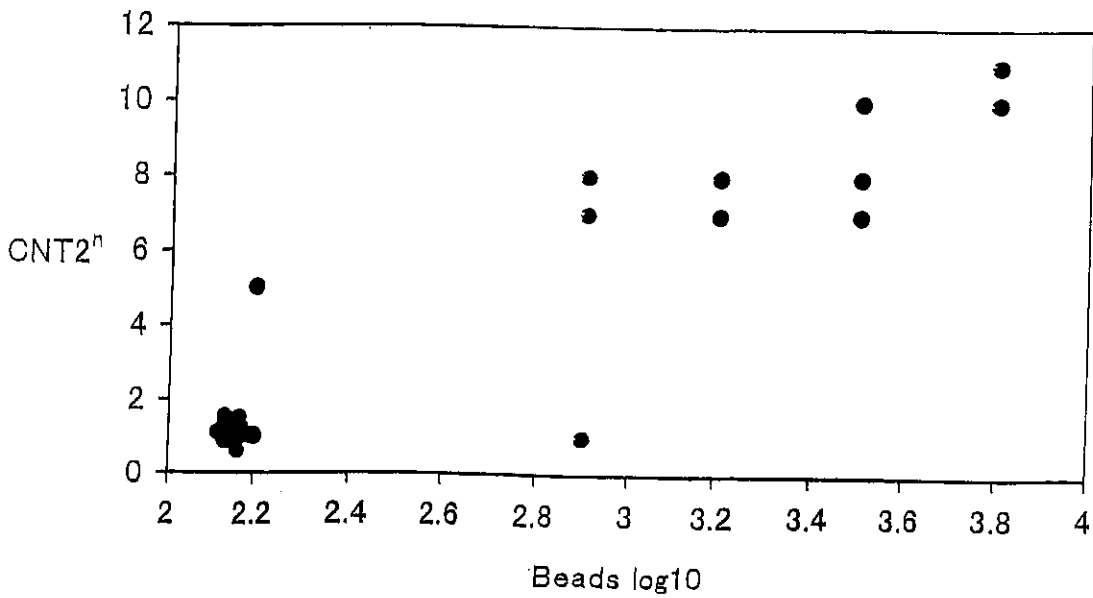
[考察] Beads 法は、感度が高く操作も簡便で迅速に行うことができるので、疫学調査に適している。  
今後、抗原抗体の反応時間、血清の希釈方法、false positive の除去法など、さらに検討を続けたい。

☒ 1

Antibody response in the monkeys infected with Mumps virus



☒ 2



## 組換え型 E1 蛋白質を抗原とする 抗風疹ウイルス IgM 抗体簡易検出試薬の開発

大久保重敏、著本 弘一、原田 義次、早澤 宏紀（森永乳業（株）生物科学研究所）  
加藤 茂孝（国立感染症研究所 ウイルス製剤部）

【目的】 バキュロウイルスによって発現された風疹ウイルスの E1 蛋白質を抗原として、抗風疹ウイルス IgM 抗体を迅速・簡便に検出する免疫クロマトグラフ系の確立を試みた。

【方法】 風疹ウイルスの外被蛋白質の一つである E1 蛋白質をコードする遺伝子領域の一部をバキュロウイルスに組込み、それを昆虫細胞に感染させた。細胞内で発現された E1 蛋白質を精製して抗原蛋白質とし、これを着色ラテックス粒子に感作した。一方、市販の抗ヒト IgM 抗体及び指示薬をメンブレン上の別々の位置にそれぞれ塗布吸着させた。これら 3 者を組合せてテストストリップを作製し、免疫クロマトグラフ法によってヒト血清と反応させた。抗体の有無は、メンブレン上の抗ヒト IgM 抗体塗布部と指示薬塗布部にそれぞれ捕捉された、組換え型 E1 蛋白質感作着色ラテックス粒子の呈色の程度を比較することにより判定した。

【結果】 ELISA によって IgM 抗体陽性と判定されたヒト血清について試験したところ、メンブレン上に塗布した抗ヒト IgM 抗体の位置に捕捉された着色ラテックスの呈色は、指示薬の位置のそれと比較して同等以上となった。更に、抗ヒト IgM 抗体の位置に捕捉された着色ラテックスの呈色の程度は、ELISA で測定された IgM 抗体レベルに依存していた。以上の結果から、本システムにより抗体保有の有無およびそのレベルの推定が可能である事が示唆された。

【考察】 今回開発した免疫クロマトグラフ法は、1) 血清を希釈する必要が無く、また、2) 直接テストストリップ上で約 10 分間と言う短時間で判定が可能であり、3) 専用の機器を必要としない等、極めて簡便な方法である。今後、臨床材料からの検出実績を充分蓄積して、ベッドサイドの臨床診断システムとして確立したい。

## 麻疹 PA キットを用いた IgM 抗体測定法の開発

佐藤 威 (国立感染症研究所 ウイルス製剤部)

【目的】麻疹（はしか）は、高熱、発疹等全身にわたる典型的な臨床症状を呈する人の急性ウイルス疾患である。従って、比較的診断が容易であることからウイルス分離や血清診断を行う機会は少なかった。WHOによる麻疹根絶計画において、発疹性疾患の鑑別診断のために麻疹IgM抗体の簡便な測定法の開発が求められている。多くのウイルス感染症の早期診断ではIgM抗体捕捉酵素抗体（ELISA）法が一般的な測定法として用いられている。しかし、ELISA法は信頼出来る方法であるが、手技が複雑で標準化が難しい事や高価な測定機器等が必要とする点に難点がある。

一方、私たちは赤血球凝集抑制（HI）試験法よりも簡便で感度、特異性にすぐれている麻疹抗体測定法として、ゼラチン粒子凝集法(セロディア麻疹「PA」)を開発した。このPA法にELISA法のIgM抗体捕捉を応用し麻疹IgM抗体の測定法の開発を試みた(以下PA-IgM法)。

【方法】IgM抗体捕捉を用いたPA-IgM法は、U底96穴マイクロプレートに抗ヒトIgM抗体を固相化し、次にこのマイクロプレートを用いて、0.5%カゼイン-PBSで麻疹患者血清を2倍階段希釈（10倍～20,480倍）し、室温3時間静置した。プレートを0.05% PBS/Tで5回洗浄後、麻疹ウイルス（豊島株）感作ゼラチン粒子(50 $\mu$ l)を加え、室温で一晩静置した。抗ヒトIgM抗体に捕捉された血清中のIgM抗体と麻疹ウイルス感作ゼラチン粒子が吸着した場合にはゼラチン粒子の凝集像が認められ抗体陽性と判定し、一方、抗体陰性の場合にはボタン状となって区別することができる。抗体価は検体希釈の終末点の逆数から求めた。

【結果】 (1) 麻疹自然感染者のIgM抗体の検出

麻疹自然感染者96人の血漿サンプルのPA-IgM抗体価の測定をした。IgGとIgM抗体を含むPA抗体は、発疹出現後第1日目から高い抗体価が検出され5日目までの間に全例陽性となった。また、PA抗体価の上昇は発疹出現後から約3ヶ月間続いた。IgM抗体は発疹出現後第3から5日目までに全例が陽性となった。IgM抗体価は発疹出現後約7から

14日目までに最高値に達し、14日目から徐々に抗体価が減衰し約3ヶ月で検出されなくなる。また、発疹出現後第1日から第3日までの54検体中9検体(16.6%)が陰性であった。この9検体はIgM抗体捕捉ELISA法で測定した場合でも陰性であった。この結果に従って、発疹出現後5日目以降に測定するとすべての麻疹患者はIgM抗体陽性となる事が分かった。また、発疹出現後1日から5日目まで31/80(40%)は、PA抗体価が $<16$ と陰性にもかかわらず、IgM抗体価が高く測定された。また、アイソトープを標識した麻疹ウイルスと発疹出現後1日から5日目までの早期のI血漿サンプルの免疫沈降法と電気泳動法により、この早期のIgM抗体は麻疹ウイルス粒子の内部蛋白のNP抗原が検出された。ウイルス粒子表面蛋白のH蛋白に対する抗体は遅れて出現する。

## (2) 麻疹ワクチン接種者のIgM抗体の検出

弱毒生麻疹ワクチン接種後、PA抗体は10日以降に検出される。PA法によるIgM抗体は、接種後10日目に検出されるようになり、14日目に抗体価がピークに達する。しかし、約3週目にはほとんどの場合IgM抗体価の低下が認められる。弱毒生麻疹ワクチン接種者のIgM抗体価は自然感染の場合と較べて著しく低い。

【考察】本法は、凝集パターンを判定する事によって麻疹ウイルスに対するIgM抗体価を測定する事に特徴がある。また、ELISA法と異なり複雑な操作や高価な測定機器を使用せずにマイクロピペット1本で測定が可能である。手技が簡単であり電気を必要としない事でどんな場所でも測定可能である。また、最終判定は凝集パターンを肉眼的に観察する事によって行える。従って、PA抗体価とIgM抗体価の両者間で比較する事が可能となった。しかし、本法で使用する麻疹感作ゼラチン粒子は通常のPA法に用いる濃度よりもさらに約10倍程度希釈して使用するために、粒子の沈降速度が遅くなり、凝集パターンの判定に室温に約16時間静置する事によって判定出来る。

【まとめ】WHOによる麻疹根絶計画において麻疹ウイルス感染を適確に診断するためにはIgM抗体測定が重要であるとして簡便なIgM抗体測定法の開発が望まれていた。本法は、大量需要の降りには更に価格を下げる事が期待されるので、麻疹の早期診断のためのWHOの要求を十分に充たす方法と云える。

また、WHOでは1999年に今まで欧米諸国で開発されたELISA法を含む種々の方法について検討したが、コストや技術的な様々な問題点が指摘された。一方、本法については簡便で再現性がある事から、WHOの麻疹根絶会議(2000年)において唯一採用される事になり、その後アフリカ、南米等の発展途上国等で検討中である。

## 麻疹 EPI に対応したウイルス (MV) 中和抗体測定法の確立

小船富美夫、片山 未来、佐藤 威、野田 雅博 (国立感染症研)  
鈴木 一義 (広島県保健環境センター)  
李 富男 (千葉県血清研究所) 和山 行正 (北里研究所 (生物製剤))  
船津 雅彦 (ウイルス検査技術連絡会中和分科会 (北里大塚))  
篠川 旦 (化学及血清療法研究所) 上田 重晴 (新潟県衛生公害研究所)  
堺 春美 (東海大学)

### 【目的】

中和(VN)試験は宿主の感染防御能を反映する信頼性の高い抗体測定法である。しかし、煩雑な組織培養と結果を得るまでに10日以上を要する。また、現行法では近年の流行MVに対する抗体測定は困難である。加えてその手技は国際的にも統一されていないため、施設間、国際間で成績の比較検討が難しい現状にある。本研究ではこれらの問題を解決し、EPI活動に有用なVN抗体の測定法を確立することを目的とする。

### 【方法】

指示細胞としてB95a細胞<sup>1)</sup>を使用する。96(もしくは48)穴プレート上で血清希釈、中和、細胞の蒔込みを行う。その具体的な方法は以下の通りである。

培養細胞：Vero細胞に代りB95a細胞<sup>3)</sup>を指示細胞に使用する。

培養液：RPMI-1640培養液(0.2% NaHCO<sub>3</sub>含)の8%ウシ胎仔血清添加を細胞の増殖培養液(GM)、4%添加を維持培養液(MM)として使用する。

#### 試験手順

96穴プラスチックプレート上で血清希釈、中和、細胞の蒔込みのすべてを行う。原則として1検体につき2希釈系列で試験する。

- 1) プレートの最前列および第2穴にそれぞれ被験血清25 $\mu$ lを分注する。
- 2) 第2穴以降すべてにMM25 $\mu$ lを分注する。
- 3) 第2穴より25 $\mu$ lを2倍階段希釈する(最終希釈倍数2~256)。
- 4) MMで希釈、調製した攻撃ウイルス100CCID<sub>50</sub>/25 $\mu$ l(血清と等量)を全穴に添加、震盪、混和する。
- 5) 37°C炭酸ガス培養器内で、90分間中和する。
- 6) 対照を置く(陰性および抗体価の判明している陽性血清、未接種細胞、培養液)。
- 7) 中和後各穴にGMに浮遊したB95a細胞50 $\mu$ lを蒔き込む(細胞浮遊液は血清希釈に加算しない)。
- 8) 震盪、混和、37°C、5%炭酸ガス培養。
- 9) 翌日、MM100 $\mu$ lを各穴に追加。
- 9) 3日培養後、判定。
- 10) 抗体価の表示

細胞変性効果(CPE)の出現を完全に阻止した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

2希釈列間で抗体価(測定値)の相違が1穴(1希釈)の場合には高い測定値を採用し、平均値は表示しない。相違が2穴(2希釈)の場合には中間値を採用する。

2希釈系列間で陰性 (< 2)、陽性 (> 2) の測定結果が得られた場合、もしくは3穴 (3希釈) 以上の相違を示す場合は再試する。

11) .攻撃ウイルス抗原の 2nd Titration

中和に用いた攻撃ウイルス量が100CCIDであることをPre-titrationと同様に確認する。

【結 果】

麻疹患児11症例の血清検体について現行法による麻疹ウイルス中和抗体価の測定結果を比較した。現行法では某臨床検査機関にて、改良法では2機関 (感染研、県衛研) でそれぞれ測定した。結果は表一1に示す通りである。すなわち、従来法、特に現在臨床検査機関で

採用されているVN抗体測定法は抗体の検出感度が極めて低いことが明かにされた。

表1 抗体価の比較

麻疹 症例	現行法	改良法	
		感染研	他機関
1	4	256	128
2	4	128	128
3	16	512	512
4	4	128	256
5	32	1,024	256
6	8	512	512
7	<4	8	16
8	4	128	64
9	<4	16	16
10	16	512	256
11	4	512	256

【考 案】

本法は再現性が高く、現行法 (Vero細胞のモノレイヤーへ接種) に比較して簡便、試験時間が大幅に短縮された。

さらに、既存麻疹ウイルス株のすべてを攻撃ウイルスとすることが可能である等の利点がある。

麻疹がポリオに次ぐ撲滅標的疾患としてEPI (予防接種拡大計画) 活動が推進されつつあるとき本法は麻疹ウイルスのVN試験標準法として極めて有用と考えられる。本法は国際的な標準法としても推奨で

きると考えられる。

文 献

1) Kobune F, Sakata H, Sugiura A : Marmoset lymphoblastoid cells as a sensitive host for isolation of measles virus. J. Virol. 64:700-705, 1990

謝辞 貴重な血清検体を御提供頂いた武内可尚 (川崎市立病院)、鈴木英太郎 (山口県鈴木小児科)、三宅 健 (東京 三宅小児科) の各先生に深謝します。本研究は厚生省科学研究費 (厚生省予防接種研究班) の助成により行われた。



## 継代培養細胞を用いた日本脳炎中和抗体測定法：CE細胞法との比較

中山 幹男、松永 泰子、新井 智、北野 忠彦、小林 正美、矢部 貞雄、新井 陽子、  
山本 紀一、山田堅一郎、田代 真人、高崎 智彦、倉根 一郎（国立感染症研究所）

協力研究機関

山本 宣雄（群馬県衛生環境研究所）、吉田 靖子（東京都立衛生研究所）

篠川 旦（新潟県保健環境科学研究所）、奥野 良信（大阪府立公衆衛生研究所）

板垣 朝夫（島根県衛生公害研究所）、小野 哲郎（大分県衛生環境研究センター）

秋山 和夫（宮城県保健環境センター）、甲木 和子（熊本県保健環境科学研究所）

目的 伝染病流行予測事業におけるヒトの日本脳炎感受性調査は、日本脳炎ウイルスに対する中和抗体価の測定をニワトリ胚初代細胞（CEと略す）を用いた中和試験法（50%プラーク減少法）により行われてきた。抗体価の表示は、標準中和曲線から得られたチャート法によった（日本脳炎ワクチン研究報告集2 1967）。この方法は、1検体につき1～2希釈のみを用いて中和反応を行い、そのプラーク減少率から50%減少を示す血清希釈倍数をチャート表から換算するもので、階段希釈を用いる方法に比べて簡略である。しかし、免疫血清を用いて得られた標準中和曲線と、ヒトの血清を用いた中和曲線には必ずしも一致しない場合がある。特に1希釈のみでのプラーク減少率からチャートで換算すると抗体価が変動することが知られている。また近年、均質な孵化鶏卵の入手が困難な地域が増えたこと、CEではプラークサイズが大きいいため直径75mmのdishを用いるので、スペースや培養液が大量に必要なこと等から、継代培養細胞を用いたいとの要望が増していた。継代培養細胞を用いた日本脳炎ウイルス中和抗体測定法について、衛生微生物技術協議会のレファレンス委員会の中に臨時に「日本脳炎抗体測定法小委員会」を設け、日本脳炎感受性調査を担当している各衛生研究所において、CE法と同時にVero細胞またはBHK細胞を用いた方法でそれぞれの血清について抗体価を測定し、そのデータを集めて比較検討する事になったのでその結果を報告する。

### 材料と方法

血清は、1996年度に各都道府県において流行予測調査のために集められた血清を用いた。CE法は従来行われていた方法を用い、抗体価は、チャート法によった。Vero細胞法は、血清を2倍階段希釈し、それぞれの血清希釈にウイルス液を等量混合し、中和後細胞に接種し、ウイルス吸着後1%メチルセルロース培地を重層した。中和抗体価は、50%プラーク抑制を示す血清希釈倍数で表した。

### 結果

#### 1) 階段希釈した血清による中和抗体価測定法の比較（CEとVero又はBHK）

350検体の1:10以上の陽性率は、CEで81%、Vero、BHKで77%であった。両方法で陽性を示した血清268検体では、±2倍以内の抗体価の一致率は95%であった。

#### 2) チャート法でのCEの抗体価とVeroの抗体価を比較

324検体の1:12以上の抗体陽性率は、CEで87%、Veroで71%であり、両方法で陽性を示した225検体では、±2倍以内の一致率は84%であった。データは、ばらつきが多く、全体的にCEの方がVeroよりも高い抗体価を示す傾向が認められた。

### 考察

抗体価測定法の比較調査の結果は、衛生微生物技術協議会のレファレンス委員会「日本脳炎抗体価測定法小委員会」での検討結果同様、血清を1:10から2倍または4倍階段希釈して中和反応を行えば、使用細胞は、CE、Vero、BHKのいずれでも結果に大きな違いはなかった。血清疫学調査に十分対応できると思われる。CEのチャート法での測定は、特に低い抗体価でCEとVeroとに相違が多く見られたが、免疫血清というアフィニティーの高い抗体で作製したチャートを、ヒトの低い抗体に応用するには、無理があったと思われる。CEチャート法で陽性、Veroで陰性の検体が多いことから、今後、伝染病流行予測事業の日本脳炎感受性調査において測定法を変更した場合、抗体陽性率に従来より低い値が出る可能性がある。しかし、Veroでの抗体測定の再現性が良いことなど、本調査結果をふまえれば、抗体測定法の変更は混乱なく実施出来るであろう。御協力いただいた、各衛生研究所の関係各位に深く感謝致します。

## セラミックスビーズを用いた新しい日本脳炎抗体測定法の開発

山本 晃

(国立感染症研究所ウイルス第一部、旭光学工業株式会社ニューセラミクス事業部)

中山 幹男、山田堅一郎、高崎 智彦、倉根 一郎

(旭光学工業株式会社ニューセラミクス事業部)

### 【目的】

日本脳炎の血清学的手法による診断は、血清あるいは脊髄液中の I g M 抗体の検出により行われるが、熱帯亜熱帯の一部の地域においては、設備の不備等により血清学的手法の実施が困難な場合がある。我々はこうした地域における日本脳炎の血清学的診断のために、ハイドロキシアパタイトセラミックスをコートしたナイロン粒子（以下；ビーズ）とマイクロプレートを用いた、簡便な抗体検出キットを開発した。この方法は抗ヒト I g M をコートした 9 6 穴プレート上で I g M を捕捉し、これと日本脳炎ウイルス抗原をコートしたビーズを反応させ、その結果得られたビーズの凝集像により血清中の抗日本脳炎 I g M を検出するものである。以降この方法をビーズ凝集法と呼び、その有効性の検証を行った結果を報告する。

### 【方法】

実験には、日本脳炎ウイルスに感染した疑いのある患者血清（n=52）、および健常日本人の血清（n=59）を用いた。各血清の日本脳炎ウイルス I g M 抗体価は IgM 捕捉 E L I S A 法により日本脳炎 IgM 抗体価を測定した。以下に I g M 捕捉 E L I S A 法の方法を述べる。抗ヒト IgM ヤギ抗体をコートした 9 6 穴マイクロプレート上で血清試料を 1：100 から 1：800 倍まで 2 倍連続希釈を行い、マイクロプレートに IgM を捕捉させた後プレートを洗浄する。さらに、0.5 μg の日本脳炎ウイルス抗原、日本脳炎ウイルスウサギ抗血清、アルカリホスファターゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を順次反応させ、p-Nitrophenyl phosphate disodium (NPD) 基質の吸光度により酵素活性を測定した。

次にビーズ凝集法の方法を述べる。抗ヒト I g M をコートした 9 6 穴プレート上で被検血清を 1：100 から 2 倍連続希釈し、30 分室温で 9 6 穴プレートに I g M を捕捉させる。9 6 穴プレートを洗浄後、日本脳炎ウイルス抗原（北京株）をコートしたビーズ懸濁液を 9 6 穴プレートに滴下し、約 2 時間静置した。血清中の日本脳炎 I g M の有無は抗原抗体反応の結果得られたビーズの凝集像により判定した。

上記の実験に加えてタイの研究機関にビーズ凝集法の評価を依頼した。実験はビーズ凝集のキットを送付し、日本脳炎ウイルス I g M陽性患者血清 (n=22) および陰性血清 (n=15) を用いてビーズ凝集法を評価した。

#### 【結果】

I g M捕捉 E L I S A法により 5 2 検体中 3 2 検体が日本脳炎 I g M陽性と診断された。これら 3 2 検体の I g M陽性血清は、ビーズ凝集法において 2 9 検体が凝集終末価 1 : 4 0 0 以上を示した。

一方、健常日本人血清は 5 9 検体全てが I g M捕捉 E L I S A法により日本脳炎 I g M陰性と判定された。これらの血清のうち 5 8 検体がビーズ凝集法の凝集終末価 1 : 1 0 0 以下であった。しかし 1 検体はビーズ凝集法により凝集終末価 1 : 2 0 0 を示した。また、I g M捕捉 E L I S A法で得られた血清希釈倍数 1 : 1 0 0 における吸光度はビーズ凝集法により得た凝集終末価と正の相関を示した。

さらに、日本脳炎の流行地域での評価を得るために、タイの研究機関にビーズ凝集キットの評価を依頼した。その結果、I g M捕捉 E L I S A法により日本脳炎 I g M陽性を示した血清 2 2 検体は、すべての検体でビーズ凝集法により凝集終末価 1 : 4 0 0 以上を示した。また、陰性血清では 1 検体をのぞく 1 4 検体が凝集終末価 1 : 2 0 0 以下を示した。

#### 【考察】

以上の結果から、ビーズ凝集法による日本脳炎 I g M診断は、凝集終末価 1 : 4 0 0 以上を陽性と判断した。その結果、ビーズ凝集法による日本脳炎ウイルス I g Mの検出は I g M捕捉 E L I S A法による結果とほぼ一致した。これらの結果はビーズ凝集法が日本脳炎 I g M抗体の検出に利用可能であることを示唆している。I g M捕捉 E L I S A法は他段階の抗原抗体反応により構成されている。一方、ビーズ凝集法は血清中の I g Mの捕捉とビーズの凝集反応により結果を得ることができるため、I g M捕捉 E L I S A法と比較して明らかに簡便である。従って、ビーズ凝集法は抗日本脳炎ウイルス I g Mの検出に有用な方法であると結論した。

#### 【文献】

Yamamoto A, et.al., J.Clin.Virology, 19(2000) 195-204.

## ウイルス技術連絡会の活動について

和山 行正（ウイルス検査技術連絡会代表幹事、北里大塚ウイルス検査研究所）

【目的】ウイルス検査における民間検査センターの役割は今後益々増すものとする。しかしながら、現在のウイルス抗体検査法の多くは、明確な標準法およびそれを管理するための標準物質がないことが問題と考えられる。ウイルス検査技術連絡会は、ウイルス検査における技術、精度の向上を目指すとともに情報の交換を相互に計ることを目的とし、民間検査センターおよび試薬メーカーの参加のもと昭和62年に設立された。現在、検査センター11社（内幹事会社は、三菱化学 BCL、BML、SRL、北里大塚ウイルス検査研究所、シオノギの5社）、および試薬メーカー12社が参加している。本会の活動としては、検査センター間の施設間差を解消するために検査のプロトコールの統一への試みや、コントロール血清を用いた種々のコントロールサーベイを行なっている。今回は、本年度行なわれたコントロールサーベイの結果について報告する。

【材料と方法】材料として各ウイルス対応参照血清及びプール血清を用いた。コントロールサーベイは、HI（赤血球凝集抑制反応）法及びFA（蛍光抗体）法について行なった。インフルエンザウイルス HI 法に7社、麻疹ウイルス HI 法、ムンプスウイルス HI 法、風疹ウイルス HI 法には、10社が参加した。HI 法の内インフルエンザウイルス HI 法は、国立感染症研究所推奨法（WHO 法）に準じ、他はウイルス実験学に準じて行なった。FA 法ではEBV のVCA IgG および EBNA について10社が参加し、方法は臨床病理学会編纂方法に準じて行なった。

### 【結果】

- 1) インフルエンザウイルス HI 法試験は、A 型 2 株、B 型 1 株の計 3 株について実施したが、WHO 法による血清希釈倍数表示で、全て中心値から  $\pm 1$  管差内であった。