

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定方法の確立に関する研究

所属 国立感染症研究所感染症情報センター
研究者 岡部 信彦

分担研究者

- (1) 国立感染症研究所感染症情報センター 新井智
- (2) 国立療養所東京病院 永井英明
- (3) 長崎大学医学部熱帯医学研究所 大石和徳
- (4) (株)BML 研究開発本部 高野昇一、齋藤剛
- (5) 万有製薬(株)研究開発本部 高橋透

要旨

近年、肺炎球菌の耐性菌が増え、ワクチンによる予防がますます重要になってきている。我が国では、肺炎球菌による抗体価測定が行われていないことから、早急に ELISA 法による標準的抗体価測定方法を確立し、肺炎球菌感染症の予防・治療に役立てる。

1. 研究目的

近年、ペニシリン耐性肺炎球菌等が増加し、肺炎に罹患しても治療に反応しないケースが増えており、肺炎球菌ワクチンの予防接種がますます重要になってきている。そこで、肺炎球菌の感染状況や予防接種の効果を把握するため抗体価の測定が必要となるが、従来行われていた RIA 法は現在ほとんど行われていない。また、それに代わるべき ELISA 法は、国内の一般の検査機関で行っているところはなく、研究者が必要に応じて個々に行っているのが現状で、標準化されたものはない。そのため、評価のツールとして、肺炎球菌感染による抗体の、ELISA 法による標準的な検出系を確立する。

また、自然感染肺炎球菌感染症について、菌の分離同定を行い、莢膜血清型を判定し総合的に肺炎球菌感染症の予防・治療に役立てる。

2. 研究方法

現在、世界的に広く用いられ、我が国でも承認されている 23 価の肺炎球菌ワクチンを用い、健常者 30 名及び慢性呼吸器疾患のある患者 195 名に、GCP に準じたインフォームドコンセントをした後にワクチンを接種。接種前と接種一ヶ月後の血液を採取し、血清を -80°C で保存し、測定法確立のための試験に供する。自然感染肺炎球菌感染症の患者から分離された菌は、10%スキムミルク溶液に溶解し、 -80°C で保存する。また、ロンドン大学の WHO Pneumococcal Serology Reference Laboratory において、ELISA 法による測定法を習得する。

3. 研究成果

肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定法の確立に資するため、健常者 30 名及び慢性呼吸器疾患患者のワクチン接種前後の血清を 109 名分確保し、更に、自然感染肺炎球菌感染者の肺炎球菌を分離し、莢膜血清型試験に供する菌株を 27 検体を確保した。

ロンドン大学の WHO Pneumococcal Serology Reference Laboratory での技術習得においては、標準血清を分与してもらうことができた。今後は、わが国において、この標準血清を確保することが必要となる。

以下に、上記ロンドン大学の WHO Reference Labo.で技術習得した ELISA 法による肺炎球菌感染症の抗体価測定方法を記載する。なお、この測定法は、わが国における標準的抗体価測定法を確立する際に、見直しが必要である。

肺炎球菌莢膜多糖類特異的 IgG 抗体の ELISA による定量法

目的

ELISA アッセイ(酵素結合免疫吸着アッセイ)を用いて、ヒト血清中に存在する肺炎球菌莢膜多糖類に対する IgG 抗体を定量すること。

本アッセイの概略

本 ELISA は、ヒト血清中に存在する型特異的 IgG 抗肺炎球菌莢膜多糖類（CPS）抗体を測定する。ヒト血清の希釈試料を型特異的 CPS コーティング済みマイクロタイタープレートに加えると、その CPS に特異的な抗体はコーティングされた抗原に結合する。結合した抗体を、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ヒト抗体、続いて p-nitrophenyl 基質を用いて検出する。生成する着色最終産物は、血清中に存在する抗 CPS 抗体量と正比例する。マイクロタイタープレート分光光度計を用いて 405 および 630 nm における吸光度を測定する。基準血清との比較により、ヒト血清中の抗 CPS 抗体レベルを決定できる。

材料

- ELISA 用マイクロタイタープレート-96 穴・平底ポリスチレン・メディウム結合プレート、Greiner、Cat 655001 または同等品
- プレート蓋-Greiner、656161
- 使い捨てポリプロピレン容器：
 - 50 ml Falcon
 - 5 ml Bijou
- 血清希釈用深皿マイクロタイタープレート、96 穴 U 底、Beckman Cat. 267004
- 秤量用皿
- Gilson ピペット-P20、P200、P1000
- マルチチャンネルピペット-12 チャンネル、50 μ l-200 μ l
- ピペット用ピペットチップ
- 滅菌 0.2 μ m フィルターユニット
- 滅菌シリンジ-20 ml、50 ml
- pH メーター
- 天秤
- ねじ蓋および注入リング付き Duran ボトル-200 $^{\circ}$ C での滅菌に耐えるもの
- 自動 ELISA マイクロタイタープレート洗浄器
- 405 nm および 630 nm フィルター付き ELISA マイクロタイタープレートリーダー
- 37 $^{\circ}$ C インキュベーター
- 卓上型ボルテクス振とう器
- 血清および試薬保存用 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C 冷蔵庫
- 血清および試薬保存用-70 $^{\circ}$ C 冷凍庫
- メスシリンダー-250 ml、1000 ml
- 180 $^{\circ}$ C オープン

試薬

- 肺炎球菌莢膜多糖類（CPS）-American Type Culture Collection（ATCC）
凍結乾燥抗原を滅菌発熱物質除去水で 1 mg/ml に再調製。混和器にて 4 $^{\circ}$ C、一晚溶解。
分注して-70 $^{\circ}$ C 保存。

| デンマーク PnPs 血清型 | カタログ# | 米国血清型# | コメント |
|----------------|-------|---------|-------|
| 1 | 164-X | Type 1 | 200mg |
| 3 | 172-X | Type 3 | 200mg |
| 4 | 176-X | Type 4 | 200mg |
| 5 | 180-X | Type 5 | 200mg |
| 6B | 228-X | Type 26 | 200mg |
| 7F | 240-X | Type 51 | 200mg |
| 9V | 256-X | Type 68 | 200mg |
| 14 | 200-X | Type 14 | 200mg |
| 18C | 248-X | Type 56 | 200mg |
| 19F | 208-X | Type 19 | 200mg |
| 23F | 220-X | Type 23 | 200mg |
| 2 | 168-X | Type 2 | 200mg |
| 8 | 188-X | Type 8 | 200mg |
| 9N | 192-X | Type 9 | 200mg |
| 10A | 232-X | Type 34 | 200mg |
| 11A | 236-X | Type 43 | 200mg |
| 12F | 196-X | Type 12 | 200mg |
| 15B | 244-X | Type 54 | 200mg |
| 17F | 204-X | Type 17 | 200mg |
| 19A | 252-X | Type 57 | 200mg |
| 20 | 212-X | Type 20 | 200mg |
| 22F | 216-X | Type 22 | 200mg |
| 33F | 260-X | Type 70 | 200mg |

- 肺炎球菌細胞壁多糖類（CWPS）－Statens Serum Institute（Cat. No.252130）
凍結乾燥抗原を滅菌発熱物質除去水で 1 mg/ml に再調製。混和器にて 4℃、一晚溶解。分注して-70℃保存。
- アルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒト IgG（4つの IgG サブクラス全て）－Biosource（AHI0705 または同等品）4℃保存
- diethanolamine－Sigma D8885
- 米国基準肺炎球菌抗血清－FDA、Laboratory of Standards and Testing（Lot. No.89-SF）
- ヒト対照血清－（検査室内で調製した対照血清）分注して-70℃保存
- p-nitrophenyl phosphate 粉末－Sigma、Cat.104-0
- polyoxyethylene 23 lauryl ether、Brij-35 溶液、Sigma、カタログ 430AG-6、30 % w/v 溶液
- 洗浄用滅菌発熱物質除去水
- 塩化ナトリウム、NaCl、BDH（10241AP）
- リン酸二水素カリウム、KH₂PO₄、BDH（102034B）
- 塩化カリウム、KCl、BDH（101984L）
- アジ化ナトリウム、NaN₃、Sigma #S-2002
- Trizma Base、Sigma #T-1503
- 塩化マグネシウム、水和物、MgCl₂·3H₂O、Sigma（M0250）
- 濃塩酸、HCl
- 水酸化ナトリウム、NaOH、BDH（102524X）
- Trizma HCl、Sigma、T3253

試薬および溶液の調製

全てのガラス器具は、エンドトキシンを除くために、使用前にオープンで 180℃、2 時間の加熱による発熱物質除去処理を行うこと。

試薬調製

10×PBS / 0.2 % NaN₃

| 重量 (グラム) | 固形成分 |
|----------|---|
| 80.00 g | NaCl, |
| 3.14 g | KH ₂ PO ₄ , |
| 20.61 g | Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O |
| 1.60 g | KCl, |
| 2.00 g | NaN ₃ |

| 容積 (ml) | 液体成分 |
|-----------|--------|
| ≈ 1000 ml | 洗浄用滅菌水 |

塩類を MilliQ 水 800 ml に溶解。MilliQ 水を加えて容量を 1000 ml とする。0.2µm フィルターを用いて濾過滅菌。滅菌容器に入れ室温で保存。pH 7.2±0.2。

コーティング緩衝液

1×PBS / 0.02 % NaN₃

洗浄用滅菌水 900 ml を 1 リットル Duran ボトルに入れ、10×PBS / 0.2 % NaN₃ 100 ml を加える。pH 7.2±0.2。

抗体緩衝液 - 1×PBS / 0.05 % Tween 20

| 容量 | 液体成分 |
|--------|------------------------------------|
| 100 ml | 10×PBS / 0.2 % NaN ₃ |
| 895 ml | 試薬品質水タイプ 1 |
| 0.5 ml | polyoxyethylenesorbitan (Tween-20) |

10×PBS / 0.2 % NaN₃、1 容に試薬品質水 9 容を加える。Tween 20 (0.5 ml/l) を加え混合。pH 7.2 ±0.2。

洗浄緩衝液

10×TBS / 1 % Brij 溶液 :

| 重量 (グラム) | 固形成分 |
|----------|-------------|
| 80 g | NaCl, |
| 1.60 g | KCl, |
| 0.94 g | Trizma Base |
| 14.56 g | Trizma HCl |

| 容量 (ml) | 液体成分 |
|---------|---|
| 33 ml | Brij-35 溶液 (30 % w/v)、Sigma #430AG-6、または同等品 |
| 1000 ml | 試薬品質水タイプ 1、または同等品 |

必要な緩衝液容量に合わせて、上記の割合で試薬を秤量する。適当なサイズの容器に総量の約 80 パーセントの水を入れ、固形試薬を溶解する。マグネティックスターラーとスターラー・バーを用いて溶液をよく混和する。1 リットルあたり 1 % w/v の濃度となるように Brij-35 を加え、よく混和する。最終容量に達するまで溶液に水を加える。最長 12 ヶ月間室温保存可。

1×TBS / 0.1 % Brij 溶液

| 容量 (ml) | 液体成分 |
|---------|------------------------|
| 100 ml | 10×TBS / 1.0 % Brij-35 |
| 900 ml | 試薬品質水タイプ 1、または同等品 |

適当な大きさの容器内で、調製した 10×TBS / 1 % Brij-35、1 容と水 9 容をよく混合する。pH 7.2±0.2。

基質緩衝液

1M diethanolamine, 0.5 mM MgCl₂

| 重量 (グラム) | 固形成分 |
|----------|--------------------------------------|
| 0.10 g | MgCl ₂ ·6H ₂ O |

| 容積 (ml) | 液体成分 |
|-----------|-------------------|
| 97 ml | diethanolamine |
| ≈ 40 ml | 濃塩酸 |
| ≈ 1000 ml | 試薬品質水タイプ 1、または同等品 |

ドラフト内で、必要な緩衝液容量に合わせて、上記の割合で diethanolamine を秤量する。適当な大きさの容器に総量の約 80 パーセントの水を入れる。秤量した diethanolamine を加え、マグネティックスターラーとスターラー・バーを用いて溶液をよく混和する。混和しながら pH が 9.8±0.05 になるまで濃塩酸を徐々に加えて pH を調製する。濃塩酸は約 30 ml 必要である。

上記割合の MgCl₂·6H₂O を秤量する。上の溶液に MgCl₂·6H₂O を溶解する。溶液が室温まで冷めるのを待つ。

pH をチェックし、必要ならば HCl で pH 9.8±0.05 に調整する。最終容量に達するまで溶液に水を加える。pH を再度チェックする。pH が 9.8±0.5 でなければこの diethanolamine 溶液は破棄する。基質緩衝液は遮光容器に入れ、最長 6 ヶ月間室温保存可。

基質停止溶液 3N NaOH

| 重量 (グラム) | 固形成分 |
|----------|----------|
| 120 g | 水酸化ナトリウム |

| 溶液 (ml) | 液体成分 |
|---------|-------------------|
| 1000 ml | 試薬品質水タイプ 1、または同等品 |

必要な 3N NaOH 容量に合わせて、上記の割合で NaOH を秤量する。適当な大きさの容器に総量の約 80 パーセントの水を入れ、ペレット状の NaOH を徐々に加えて溶解させる。このステップは強い発熱反応であり、非常に大きな熱を発生するため注意が必要である。マグネティックスターラーとスターラー・バーを用いて溶液をよく混和する。最終容量に達するまで溶液に水を加え混和する。最長 12 ヶ月間室温保存可。

凍結乾燥材料の再懸濁

凍結乾燥材料のバイアルを冷凍庫から取り出し、室温になるまで待つ (約 1 時間)。密栓を外し、凍結乾燥材料が外部に漏れないように注意する。必要な容量の滅菌発熱物質除去水をバイアルに加え、再び栓をする。バイアル上部の凍結乾燥材料にも水が十分行きわたるようにバイアルを静かに振とうし、4℃で一晩インキュベートする。

インキュベート後バイアルを取り出し、静かに振とう混和する。エッペンドルフチューブに分注し、試薬名、調製日、ロット番号および調製者のイニシャルを記したラベルを付け、-70℃で保存する。

使用者への注意

- 全ての試薬、および抗原コーティング済みプレートは使用前に室温に平衡化すること。
- 使用前に、全ての緩衝液や溶液の、糸状物や混濁などの汚染徴候の有無をチェックすること。汚染徴候があればその溶液は破棄すること。
- 検査室内で調製された全ての試薬の容器には、試薬名、調製日と調製者名、使用期限、保存条件および開封日を表示すること。
- バッチ番号記録用紙には、全てのロット番号（すなわち、プレート、QC、酵素結合抗体、コーティング緩衝液など）を控えておくこと。
- 全てのガラス器具については、エンドトキシンを除去するために、使用前に 180℃のオーブン内で少なくとも 2 時間の加熱による発熱物質除去処理を行うこと。
- 試薬は、過去に界面活性剤で洗浄したことの無いガラス器具を用いて調製すること。これは、ガラス器具に界面活性剤が残存していると、抗原への抗体の結合が阻害される可能性があるからである。
- プレートの乾燥を防ぐため、洗浄ステップから長くとも 10 分以内に試薬を加えるよう常に心掛けること。
- 全てのマイクロタイターウエルを均等に 37℃でインキュベートするために、プレートは重ねるのではなく 1 個ずつ並置すること。

方法

型特異的 CPS 抗原のマイクロタイタープレートへの吸着

滅菌発熱物質除去水を用いて型特異的 CPS の 10 μ g/ml 溶液（-70℃保存の分注凍結試料は 1 μ g/ml）を調製する。

マイクロタイタープレートの各ウエルに、CPS 抗原をピペットで 100 μ l ずつ分注する。

プレートをプレート蓋で覆い、37℃にて 5 時間または 4℃にて 18 時間インキュベートする。プレートを重ねないこと。シールしたプレートは、使用時まで 4℃にて最長 1 ヶ月間は問題なく保存できる。

ヒト血清検体（未知血清）の試験

1. 全ての血清試料、対照および基準血清を、使用前に、室温にて 30 分間解凍する。使用が終わった試料はただちに冷凍庫に戻す。試料は 3 回を超えて凍結・解凍を繰り返さないように、解凍のたびに試料の蓋にフリーザーペンで印を付ける。
2. コーティング済みプレートを冷蔵庫から取り出し、洗浄緩衝液および抗体緩衝液を準備する。
3. プレートを洗浄緩衝液に 1 回浸漬し、同緩衝液で 4 回洗浄する。
4. 抗 CWPS 抗体を中和するための CWPS / 抗体緩衝液を用いて、被験血清、内部対照および基準血清の開始希釈度試料（10 μ g/ml）を調製する。室温で 30 分間インキュベートしたのち、必要に応じて抗体緩衝液で希釈する（通常は 2 ないし 3 倍）。標準試料として基準血清 89-SF を使用するとともに、アッセイ間変動をモニタリングするために検査室内対照も加える。希釈が終わったら、血清を、まず最も希釈度の高い試料から希釈プレートに移す。
5. 洗浄緩衝液にてプレートを 1 回浸漬、4 回洗浄。
6. マルチチャンネルピペットを用いて、各希釈血清を 50 μ l ずつ、希釈プレートから洗浄済みプレートに移す。プランクとするために、各プレートあたり 2 つのウエルには抗体緩衝液のみを加える。プレートをプレート蓋で覆い、室温にて 2 時間または 18 時間インキュベートする。

抗体検出

7. 洗浄緩衝液にてプレートを 1 回浸漬、4 回洗浄。

8. ヤギ抗ヒト IgG 酵素結合抗体を抗体緩衝液で適宜希釈する。希釈した酵素結合抗体を全てのマイクロタイタープレートに 100 μ l ずつ加える。プレートをプレート蓋で覆い、室温にて 2 時間インキュベートする。

発色

9. 洗浄緩衝液にてプレートを 1 回浸漬、4 回洗浄。
10. 使用前 15 分に、p-nitrophenyl phosphate の 1 mg/ml 溶液を、diethanolamine 基質緩衝液を用いて調製する。基質を振とう器で混和するが、遮光のために基質をペーパータオルで覆うこと。
11. プレートを 1 回浸漬、4 回洗浄。
12. 基質溶液 100 μ l を全てのマイクロタイタープレートウェルに加える。プレートをプレート蓋で覆い、室温にて 2 時間インキュベートする。
13. 基質インキュベーション時間終了時に、3N NaOH を全ウェルに加えて反応を止める。
14. 少なくとも 5 分間経過後、マイクロタイタープレートリーダーにプレートを載せ、630 nm リファレンスフィルターを付けて、405 nm における吸光度を読む。プレートブランクを本 ELISA のブランクとする。

データ解析

データ解析は、曲線部分を含む log/lin スケーリング S 字曲線を用いれば、Genesis または Revelations により実施可能である。

各血清試料の抗体濃度は、連続希釈試料の平均値を計算して求める。S 字曲線の直線部分の OD 値を用いれば、抗体レベルはより正確に求められるであろう。

理想的には、連続希釈試料の希釈系列内 CV は 20 %未満となるべきである。S 字曲線の曲線部分に当たる希釈を用いると、しばしば CV が 20 %を超えるため、平均値の計算にはこれらの部分を用いるべきではない。希釈系列内 CV の全てあるいは大部分が 20 %を超える場合には、血清試料を再アッセイすること。

連続希釈血清試料のアッセイ内 CV が 20 %未満の場合には、プロット直線は基準対照血清と平行になるはずで、平均値を示す。アッセイ内 CV が 20 %を超過し、計算された血清試料中の抗体濃度が常に増加または減少している場合には、直線は平行ではないと結論する。計算により得られた濃度の中央値を報告するとともに、値が平行ではない直線から得られたものであることを明記する。

精度管理

対照血清は、全てのプレートの低希釈度および高希釈度の領域に含めること。対照について計算された抗体レベルは、定められた平均値の 20 %を超えてはならない。これらの精度管理チェックを満たさないプレートについては、再検を行うこと。

衛生と安全

ヒト血清を扱う際には必ず手袋と防御衣を着用すること。

ピペットチップおよび汚染のおそれのある全ての材料は、オートクレーブ用バイオハザード・廃品バッグに廃棄すること。

各アッセイ終了時には、1 % Virkon 液で実験台を拭うこと。こぼれた血清は、1 % Virkon 液で 3 分間覆ったのちふき取り、バイオハザードバッグに廃棄すること。こぼれた量が多い場合には Neat Virkon パウダーを使用するとよい。

硫酸を扱う際には、眼保護具とニトリル製手袋を着用すること。硫酸溶液は常にドラフト内で調製すること。

4. 考 察

肺炎球菌感染症のわが国における標準的抗体価測定法確立のための準備段階は、試験材料の確保、ロンドンにおける測定技術の習得、標準血清の確保で一通り整った。
今後は、わが国の研究機関がこの標準血清を入手することができるか、また、陽性コントロールの作成ができるかということが課題となる。

5.まとめ

健常者 30 名および慢性呼吸器疾患患者 117 名に肺炎球菌ワクチンを接種し、接種前後の血液を採取し、肺炎球菌感染症の標準的抗体価測定法を確立するために必要な血清を 109 名分確保した。また、莢膜血清型を調べるための菌株も、27 検体確保した。

さらに、ロンドン大学の WHO Reference Labo.にて、測定法の技術習得をし、標準血清も入手することができたので、ELISA 法による標準的抗体価測定法を確立する準備が整った。

6. 研究発表 なし

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
重点研究報告書

第5分野

健康保持増進・予防医薬品の開発に関する研究

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社