

ELISAによる日本住血吸虫抗体検査のための マイクロプレートの検討

Evaluation of ELISA-Microplate Method
for Use Schistosomiasis

葉袋 勝 梶原 徳昭

Masaru MINAI and Noriaki KAJIHARA

山梨県の日本住血吸虫症流行地における疫学調査を目的とした患者検索法は、免疫学的検査でスクリーニングを行い、この陽性者に対しMIF集卵法検便を実施し本症の感染者を把握している。この免疫学的検査法としては、以前は皮内反応を実施していたが、現在ではELISAによる血中抗体価測定検査を実施している。ELISAは、大量の検体を迅速に測定し、得られた結果を直接コンピュータ処理できるため大変有用であるが、この反応の感度は非常に高いため非特異反応が起こる可能性があり各種の要因の管理が必要である。近年、ELISA用マイクロプレートが各社より数多く発売され、マイクロプレートによる変動の検定が必要となってきた。筆者は、各種のマイクロプレートの違いによって生じると予想される、ELISAの結果の変動について検討した。

材料及び方法

ELISA用マイクロプレート：PT1 (D社), PT2 (D社), PT3 (S社), PT4 (T社), PT5 (T社), PT6 (C社)の4社6種のマイクロプレートを使用した。なお、PT2はPT1の感度を上げたもの、またPT5はPT4に γ 線を照射したものである。

陽性コントロール血清：当研究所で実施した検査において、日本住血吸虫抗原に対し高抗体価を示した血清をプールのものを使用し、稀釈液には1%BSAを使用した。

日本住血吸虫抗原：感染マウスより得た成虫体及び虫卵を松田¹⁾の方法で作製し使用し、0.05 Mol 炭酸緩衝液 (Ph 9.6) で稀釈し固相化に使用した。

ELISA：中尾²⁾の方法に準じて実施した。すなわち、炭酸緩衝液で稀釈された抗原を各々のELISA用マイクロプレートに分注し37℃ 120分反応させ、PBS/Tweenにより3回洗浄し、2%BSAで30分間再処理後、陽性コン

トロール血清を37℃30分反応させた。更に3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGヤギ血清 (Peroxidase Anti-Human IgG H+L(gt) :Miles Scientific) で37℃30分反応させ、3回洗浄し、O-フェニールジアミンで25℃30分反応させ、8N硫酸溶液で反応を停止し、比色測定 (500nm) した。比色計は、ダイナテックMR580を使用し、ケーブルを介し沖電機IF800-30に入力し解析した。血清稀釈系列を12回繰返実施し、平均O.D.値で示した。このO.D.値と各血清稀釈濃度よりえられた検量線で、O.D.値0.2で読まれた稀釈倍数を抗体価とした。

結果及び考察

ELISAによる血中抗体測定法のうちの抗原固相法はマイクロプレートの管底または、ビーズ表面に抗原を吸着後、固相化された抗原に対し血中抗体を反応させて、さらに酵素標識抗体を反応した後、固相化抗原に反応し存在する酵素について比色定量する。したがって、反応過程が多段階にわたるため多くの非特異反応が生じることが予想される。この反応過程のうちの抗原の固相化は、使用される素材と抗原の物理化学的親和性が大きな影響を持ち^{3,4)}、マイクロプレートの素材の違いがELISA成績の変動要因になり得ると予想される。

近年 ELISAが多くの検査で用いられるようになってくるにしたがい、各種のELISA用機材や試薬が開発販売され、マイクロプレートも多品種が入手できるようになった。このためにマイクロプレートの評価も必要となり、メーカーの違いがELISA成績を変動させる要因であり、しかも特定のマイクロプレートが安定した成績を出すのではなく、固相化される抗原の差異よっても異なる成績が出されている^{3,5)}。これらの結果はいずれも抗原がウィルス由来であり、限定された結果とも考えられるが、日本住血吸虫症の血中抗体価測定においてもこの

様な成績の変動が予想されるため4社6種のマイクロプレートについて検討を行った。

日本住血吸虫検査で用いられる成虫体抽出抗原(虫体抗原)及び虫卵抽出抗原(虫卵抗原)の2種類の抗原を炭酸緩衝液により吸着させた各プレートを使って得られた結果を表1, 2及び図1, 2に示した。虫体抗原を固相化した結果で見ると, 血清希釈列によるO.D.値の関係は(図1), 明確ではないが, PT1, PT2, PT3及びPT6の群とPT4, PT5の2群に分けられる。各々の抗体価は(表2)PT1の値を1とした場合, PT2, PT3, PT4, PT5の及びPT6の値は, 1.52, 1.25, 0.85, 0.88, 及び1.05であり大きな差は見られなかった。一方, 虫卵抗原の固相化による結果を血清希釈列とO.D.値の関係で見ると(図2), 明らかにPT1, PT2, PT3及びPT6の群とPT4, PT5の2群に分けられる。各々の抗体価は(表2)PT1の値を1とした場合, PT2, PT3, PT4, PT5及びPT6の値は, 1.83, 1.91, 0.92, 1.46及び2.31であり虫体抗原と異なり大きな差が見られた。虫体抗原と虫卵抗原についての関係を, それぞれの

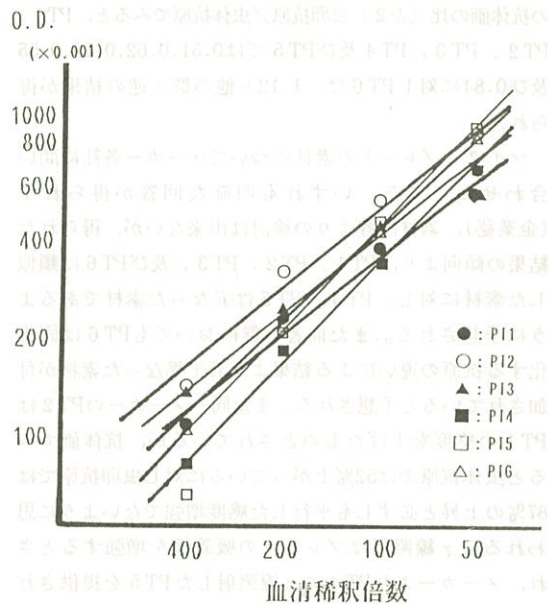


図1 マイクロプレート別 ELISA O.D.値と血清希釈倍数の関係
使用抗原: 日本住血吸虫成虫抗原

表1 各マイクロプレート別 ELISA 平均 O.D. 値

プレート名	ELISA 平均 O.D. 値 (× 0.001)							
	血清希釈濃度 (虫体抗原)				血清希釈濃度 (虫卵抗原)			
	× 50	× 100	× 200	× 400	× 50	× 100	× 200	× 400
PT1	563	383	211	105	435	196	111	37
PT2	835	520	326	146	799	456	219	73
PT3	563	449	244	135	743	413	220	88
PT4	661	348	189	79	513	187	74	10
PT5	835	435	215	63	952	426	177	32
PT6	800	425	220	103	985	388	257	122

表2 マイクロプレート別 ELISA 抗体価

プレート名	虫体抗原 (A)	ELISA 抗体価			
		PT1=1	虫卵抗原 (E)	PT1=1	E / A
PT1	200.0	1	102.1	1	0.51
PT2	303.2	1.52	187.0	1.83	0.62
PT3	249.1	1.25	194.7	1.91	0.78
PT4	170.7	0.85	94.0	0.92	0.55
PT5	176.8	0.88	149.4	1.46	0.84
PT6	210.8	1.05	236.0	2.31	1.12

の抗体価の比(表2)虫卵抗原/虫体抗原でみると, PT1, PT2, PT3, PT4及びPT5では0.51,0.62,0.78,0.55及び0.84に対しPT6は 1.12と他の群と逆の結果が得られた。

マイクロプレートの素材についてメーカー各社に問い合わせたところ, いずれも明確な回答が得られず(企業秘), 素材内容よりの検討は出来ないが, 得られた結果の傾向より, PT1, PT2, PT3, 及びPT6は類似した素材に対し, PT4, PT5は異なった素材であるように予想される。また前者の群においてもPT6は固相化する抗原の違いによる結果より若干異なった素材が付加されていると予想される。また同一メーカーのPT2はPT1の感度を上げたものとされているが, 抗体価でみると虫体抗原では52%上がっているに対し虫卵抗原では87%の上昇と必ずしも平行した感度増強でないように思われる。 γ 線照射はプレートの吸着性を増強するとされ, メーカーよりPT4に γ 線照射したPT5を提供されたが, 抗体価は虫卵抗原では58.9%の上昇に対し虫体抗原では変化はしなかった。

以上の結果より, 日本住血吸虫由来の抗原によっても, 固相化されるマイクロプレートの相異によって得られるELISA成績が異なる事が明らかとなり, ELISAを開始するにあってはマイクロプレートの管理が必要と考えられる。

文 献

- 1) 松田 肇ら: 寄生虫誌, 30, 363~372 (1981)
- 2) 中尾 稔ら: 寄生虫誌, 30, 197~204 (1981)
- 3) 玉川 重徳ら: 臨床とウイルス, 9, 427~430 (1981)
- 4) 高坂 彰ら: 臨床病理, 30, 969~977 (1982)
- 5) 南嶋 洋一ら: 臨床とウイルス, 9, 415~419 (1981)

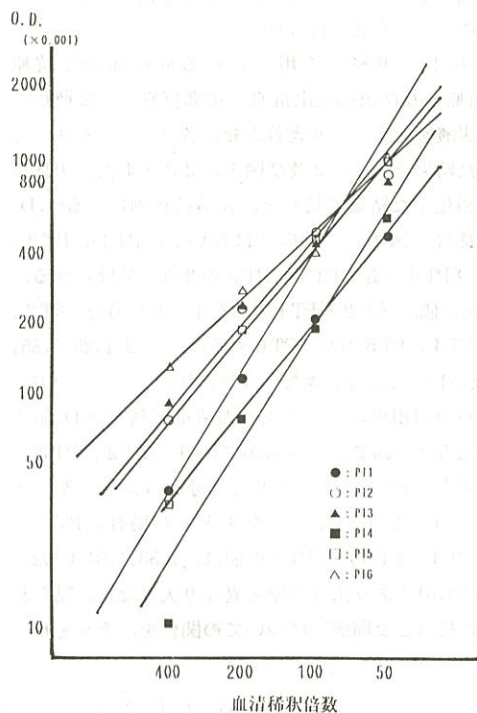


図2 マイクロプレート別 ELISA O.D値と血清稀釈倍数の関係
使用抗原: 日本住血吸虫虫卵抗原

血清稀釈倍数	PT1	PT2	PT3	PT4	PT5	PT6
400	0.51	0.62	0.78	0.55	0.84	1.12
200	0.51	0.62	0.78	0.55	0.84	1.12
100	0.51	0.62	0.78	0.55	0.84	1.12
50	0.51	0.62	0.78	0.55	0.84	1.12