

# Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) によるヒト及びイヌロタウイルスの抗原検出と ブタ、ウシ及びヒトロタウイルスの抗体測定

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human and canine rotavirus antigens and porcine, bovine and human anti-rotavirus antibodies.

山西重機・三木一男・山本忠雄

## Abstract

Enzyme-immunosorbent assay (ELISA) for detection of rotavirus antigen and its antibody was applied and compared with usual assay systems.

A total of 147 human fecal specimens was examined for the presence of rotavirus antigen by ELISA comparing with electron microscopy (EM).

Ninety-two specimens were rotavirus positive by both ELISA and EM tests, and 46 were negative.

Three specimens were positive by EM but negative by ELISA and the remaining 6 specimens were positive by ELISA and negative by EM tests.

Fifteen fecal specimens of canines were also examined by ELISA and EM tests. All samples were positive by both methods.

The sensitivity of antigen detection by ELISA test was 4- to 32-fold higher than that by reverse passive hemagglutination (R-PHA) test.

Antibody titration by ELISA and immune adherence hemagglutination (IAHA) was done with human, bovine and porcine sera. Antibody titers by ELISA were agreeable with those by IAHA tests.

Antibody determination by ELISA is considered to be very useful especially for the seroepidemiological studies.

## I 序 文

1973年オーストラリアのBishop<sup>1)</sup>らの報告以来、ロタウイルスの検出は、電子顕微鏡による観察が一般的方法として定着しているが、直接形態観察のため糞便中の粒子数の多寡、または観察者の経験に左右され、定量化が困難であり、かつ高価な設備が要求される。簡便な代替法が望まれ、色々な方法が開発応用されてきている<sup>2) 3) 4)</sup>。

今回、流行時のロタウイルス検索のために、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)の使用を検討、併せてロタウイルスの侵淫度を掌握するため、ヒトを含め各動物の抗体測定法についても検討したので、その概要について報告する。

## II 材料及び方法

### 1 ウイルス

ウシロタウイルス(BRV)Lincoln株、ヒトロタウイルスWa株(血清型I、亜群II)、S<sub>2</sub>株(血清型2・亜群I)、Yo株(血清型3・亜群II)、Hochi株(血清型4・亜群II)、マウスロタウイルス(MRV)、サルロタウイルス(SRV)SA-11株は国立予防衛生研究所、松野重夫博士より分与をうけた。分離株は香川県下の乳児嘔吐下痢患者糞便から分離した。

### 2 ブタ血清

香川県下で飼育されていた生後6~7カ月の屠殺豚から採血した。

### 3 ウシ血清

香川県下で飼育されている4~6歳の乳牛の血清を、香川県東部家畜保健衛生所より分与をうけた。

ヒト血清及び糞便材料：香川県感染症サーベイランス事業の定点病院を受診した下痢症及びその他の患者の血清及び糞便を用いた。

### 4 イヌの糞便材料

県下の動物病院を受診したイヌより採取した。

### 5 ELISAによるロタウイルスの検出

抗原：BRVをMA-104 (アケガザル腎)細胞で増殖、超音波で細胞破壊し1,500×g 10分遠心しその上清を100,000×g 2時間遠心、その沈渣について塩化セシウム連続密度勾配遠心法でウイルスを精製し、免疫用抗原と抗体測定の吸着抗原とした。

抗ロタウサギIgG：BRVに対してIAHA価で51,200倍のウサギ免疫血清を硫酸分画し、Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィーで再分画した。

標識抗体：抗ロタウサギIgGのペルオキシダーゼ標識は、horseradish peroxidase (HRPO, 東洋紡)を用い、WillsonとNakaneの方法<sup>5)</sup>で標識し、Sephacryl S-200 カラムクロマトグラフィーで分画し、蛋白と酵素の最適比フランクションを採取し、プールして実験に供した。

### 6 ELISAによる抗原検出方法

プレートに抗ロタウサギIgGを4℃で一夜吸着し、

Tween20加PBS(PBS-T)で3回洗浄後、検査材料(糞便10%乳剤を1,500×g, 30分遠心し、その上清)を加え37°C 1時間反応させ、再びPBS-Tを3回洗浄したのち、HRPO標識抗体を加え、37°C 1時間反応させ、更にPBS-Tで3回洗浄、基質として0.05% o-phenyldiamineを加え、遮光して室温1時間静置し、4N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で反応を停止させ、波長490nmでODを測定した。cut off値は、電顕法陽性例の最低ODからみて対照陰性材料の10倍OD値と決めた。

### 7 ELISAによる抗体検出

標識抗体: プタ血清中の抗体検出は、HRPO標識抗プタIgGウサギIgG、ウシ血清中の抗体検出は、HRPO標識抗IgGウサギIgG、ヒト血清中の抗体検出は、HRPO標識抗ヒトIgGヤギIgG(カッペル社, USA)をそれぞれ用いた。

抗体検出法: プレートにBRV抗原を4°Cで一夜吸着しPBS-Tで3回洗浄後、PBS-Tで希釈した血清を加え、37°C 1時間反応させ、再びPBS-Tで3回洗浄し、HRPO標識抗体を加え、これ以降の操作は抗原検出と同様にした。

ELISA価は、IAHA 価で640~1,280倍のウシ、プタ、ヒトの陽性血清をそれぞれ3~4例プールして標準陽性血清とし、この標準曲線からELISA価を求めた。cut off値を陰性血清およびIAHAとの相関によって10ELISA価とした。

### 8 IAHA法

BRVをMA-104細胞で増殖、超音波処理をし、1,500×g 30分遠心し、その上清を抗原とした。被検血清はカオリン処理後使用した。方法は、井上ら<sup>7)</sup>の方法にしたかった。

### 9 R-PHA法

日水社製のロタ・セルキットを用いた。

### 10 ラテックス凝集反応(LA)

第1化学薬品㈱のロタレックスキットを用いた。

### 11 電子顕微鏡観察法(電顕法)

糞便からのウイルス粒子の抽出と精製は、Bishopらの方法<sup>9)</sup>に準拠し、1%酢酸ウラニル溶液でnegative染色、100S型電子顕微鏡(日本電子)を用い、加速電圧80Vで観察した。

## III 成績

### 1 ELISAによるヒトと動物ロタウイルス株間の検出限界の比較

ELISAによってヒトと動物のロタウイルス株間での検出限界を知るために、ヒトロタウイルスの標準株であるWa株, S2株, YO株, Hocht株および香川県内の下痢症

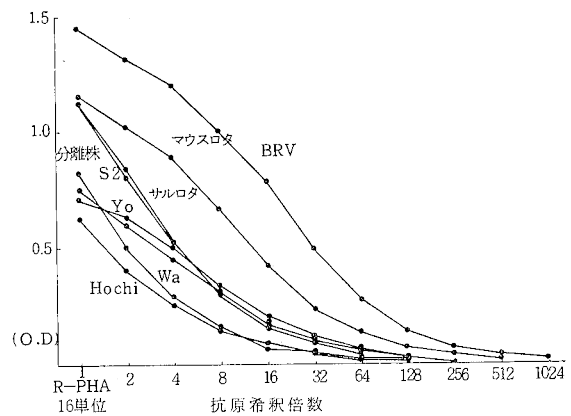


図1 株間における比較と検出の限界

患者からの分離株、(BRV)Lincoln株、(SRV)SA-11株及びMRVを使用した。

その結果は図1に示した。R-PHAで16単位を基準にして、それぞれの株についてELISAでODを比較した。各株間のODには差が存在した。Wa株1.06, S2株1.16, YO株0.72, Hocht株0.63, 分離株0.83, Lincoln株1.45, SA-11株1.14, MRV1.14であった。この結果、S2株、Lincoln株、SA-11株、MRVは高い値を示し、Wa株、YO株、Hocht株、分離株は低い値を示した。一方、ELISAの検出感度をみるため、調整した抗原を二段希釈するとLincoln株では、256~512倍まで検出可能であったがヒトの標準株ならびに分離株では、64~128倍であった。

### 2 電顕法とELISAの比較

ヒトとイヌの糞便を使用して電顕法のELISAを比較した。表1に示すようにヒト糞便147例中電顕法でロタウイルス陽性95例、陰性38例、ロタウイルス以外のウイルス(アデノウイルス、カリシウイルス)陽性14例であった。ELISAではロタウイルス陽性98例、陰性49例であった。電顕法とELISAで陽性のもの92例、電顕法陽性で陰性のもの3例、ELISA陽性で電顕法陰性6例、両法陰性のもの46例であり、両法の一致率は147例中138例(93.9%)であった。

また、イヌ糞便で比較検討した結果、両法共に陽性5例、陰性10例で全て一致した。

表1 電顕法とELISAの比較

	ELISA ロタウイルス陽性		ELISA ロタウイルス陰性	
	ヒト	イヌ	ヒト	イヌ
電 顕 法 ロタウイルス陽性	92 (96.8)	5 (100)	3 (3.2)	0 (0)
電 顕 法 ロタウイルス陰性	6 (15.8)	0 (0)	32 (84.2)	10 (100)
ロタ以外の ウイルス陽性	0 (0)		14 (100)	

### 3 LA法とELISAの比較

ヒト糞便を用い、ELISAと電顕法でロタウイルス陽性の25例をLA法で検討した結果、全例がLA法で陽性となった。また、ELISAと電顕法で陰性12例のうち11例(91.7%)はLA法陰性であったが1例(8.3%)をLA陽性となった。

表2 ラテックス凝集法とELISAの比較

	LAロタウイルス陽性	LAロタウイルス陰性
ELISA ロタウイルス陽性 (電顕法) ロタウイルス陽性	25 (100.0)	0 (0)
ELISA ロタウイルス陰性 (電顕法) ロタウイルス陰性	1 (8.3)	11 (91.7)

### 4 ELISAによるヒト及び動物ロタウイルス抗体の測定

各動物血清のELISAとIAHA法による抗体価の関係は図2、図3、図4に示すように、ブタで相関係数(r) 0.829、ウシで  $r = 0.707$ 、ヒトで  $r = 0.767$  の危険率1%以下で有意の相関がみられた。

また、ヒト血清123例についてELISA価の年齢分布をみると表3のように1歳33.3%、2~3歳で69.2%、4~5歳で81.2%、6~7歳で89.2%、8~9歳で95.6%、10~11歳で94.4%、12歳以上で100%となった。各年齢における抗体価分布及び平均抗体価は図5のとおりであった。

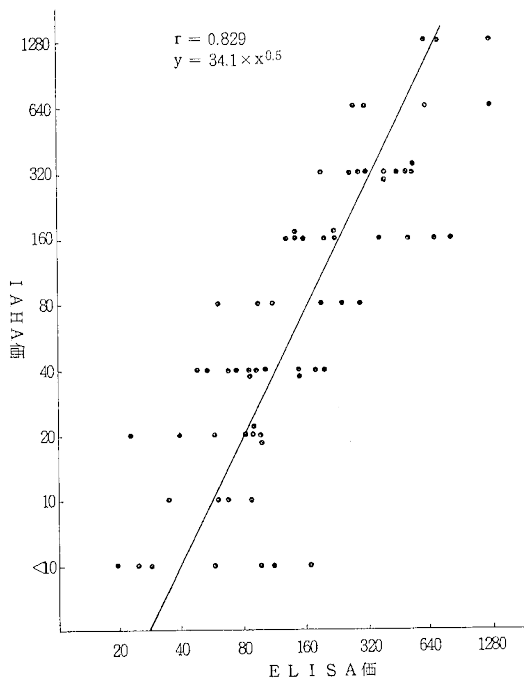


図2 豚血清中のELISA価とIAHA価の比較

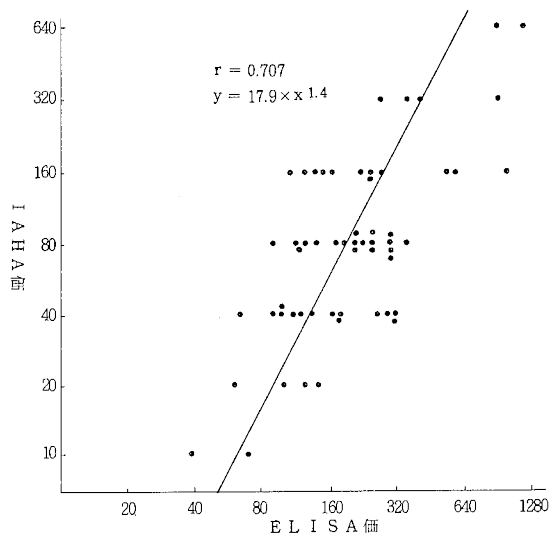


図3 牛血清中のELISA価とIAHA価の比較

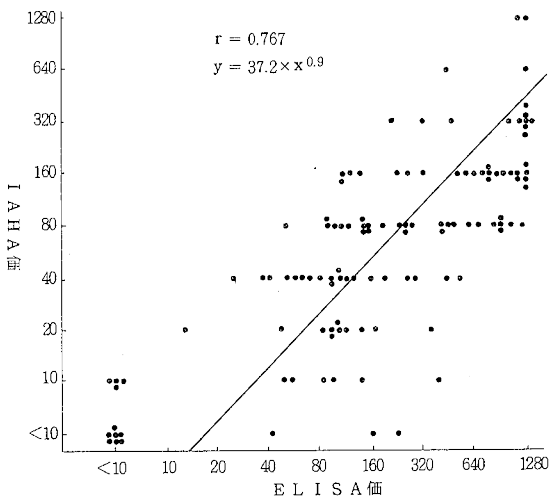


図4 ヒト血清中のELISA価とIAHA価の比較

表3 ヒトの年齢別抗体保有率

	検査件数	陽性数	抗体保有率
1 以下	6	2	33.3
2 ~ 3	13	9	69.2
4 ~ 5	16	13	81.2
6 ~ 7	28	25	89.2
8 ~ 9	23	22	95.6
10 ~ 11	18	17	94.4
12 ~ 13	12	12	100.0
14 ~ 15	7	7	100.0
計	123	107	87.0

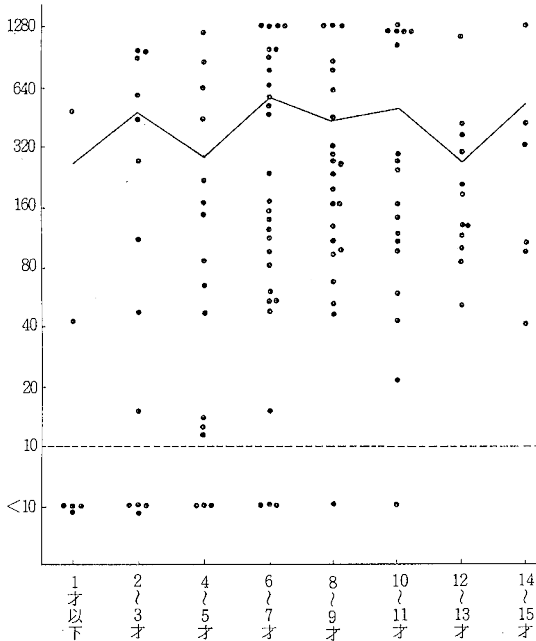


図5 ヒトの年齢別ELISA値の保有状況

#### IV 考 察

ヒトロタウイルスは組織培養細胞による分離増殖法<sup>7)</sup>が確立する以前にウイルス粒子が確認<sup>6)</sup>され、さらに糞便中に大量の粒子が排拮されるため、抗原検出法が色々検討され、電顕法<sup>6)</sup>、LA法<sup>2)</sup>、IAHA法<sup>3)</sup>、R-PHA法<sup>4)</sup>、ELISA<sup>8)</sup>などが応用されている。この中で操作が簡単で感度の良い事で、Yolken<sup>9)</sup>の報告以来、広く試みられているELISAをウイルスの迅速診断に応用するために検討した。従来の電顕法とELISAを比較すると、電顕法陽性でELISA陰性の3例は、ELISAの感度以下のウイルス粒子が電顕法で観察されたかあるいは、ウイルス粒子に糞便中のIgA抗体の付着している可能性も考えられる。また、従来の定形ロタウイルスと抗原性が異なる非定形ロタウイルスが世界各地で分離されている<sup>9)~13)</sup>が、この非定形ロタウイルスである可能性もある。

また、ELISA・電顕法とLA法の比較では、ELISA・電顕法陰性でLA法陽性が1例、他は全例一致した。このことは、田島ら<sup>14) 15)</sup>、勝島ら<sup>16)</sup>、田沢ら<sup>17)</sup>の成績のほぼ同様であった。

イヌロタウイルスでは、電顕法でロタウイルス陽性5例と陰性10例を用いてELISAで検討したが全例一致した。この事実は、動物のロタウイルスでもELISAが使用可能であることが確認された。

各株間におけるELISAとR-PHA法の検出の比較は、

R-PHA法で16単位に合わせた抗原液を用いて測定すると、各株間のOD値に差がみられ、HomologousのBRVが高く、ついで亜群Iに属するMRV、SRV(SA-11)、ヒトロタウイルスS2株となり、亜群IIに属するヒトロタウイルスWa株、YO株、Hochi株及び分離株は低くなった。この結果から、分離株は亜群IIに属すると考えられる。

また感度をみるため、この抗原を二段階希釈すると、BRVとMRVが感度良く検出でき、R-PHA法はCF法よりも感度が4~8倍高いとされるが<sup>18)</sup>、そのR-PHAよりELISAは4~32倍感度が高かった。

また、ロタウイルスの抗体測定は、CF、IAHA<sup>19)</sup>、中和反応、ELISA<sup>20)</sup>などが利用されている。今回、多量の検体の測定が可能なELISAについて検討を行った。ブタ血清64例、ウシ血清57例、ヒト血清120例について、それぞれの危険率1%以下で0.829、0.707、0.767の有意の相関がみられ、従来の検査法に替わってブタ、ウシ血清でも十分に利用できることが判明した。またIAHAはCF法に比較すると2~4倍感度は高いが、前期産生のIgGに対しては、affinityが弱く<sup>21)</sup> 図2~4でのプロットは、全体に右方へ移動もしくは、IAHA抗体陰性、または近い抗体価を示すがELISAでは前期IgGについても高い抗体価を示し感度の良いことが確認できた。一方、血清処理についてもヒト、動物にかかわらず特別な処理方法がいらず簡便である。

ELISAによるヒト抗体の年齢分布に関する報告は少ないが、曲ら<sup>22)</sup>は出生直後から2カ月までは移行抗体のIgGの検出率が80%以上で、その後、1歳で38%、2歳以降でplateauに達すると報告している。今回の調査では抗体保有率が80%に達するのは4歳以降であった。先にIAHA法で調査した成績<sup>23)</sup>と比較すると、生後6カ月から1歳で16.6%、1歳で35.7%、4歳で70.5%で傾向としては一致するが、陽性率の差はその方法の感度による差と考えられた。

以上の結果からELISAは血清疫学に対しても非常に有用であると考えられる。

#### 文 献

- 1) Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, Ruck BJ (1973). Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute nonbacterial gastroenteritis, *Lancet* 2 : 1281-1283.
- 2) Sanekata T, Yoshida Y, Okada H (1981). Detection of rotavirus in faeces by latex agglutination, *J Immunol Methods* 41 : 377-385.
- 3) Matsuno S, Nagayoshi S (1978). Quantitative

- estimation of infantile gastroenteritis virus antigens in stools by immuno adherence hemagglutination test, *J Clin Microbiol* 7 : 310 - 311.
- 4) Sanekata T, Yoshida Y, Oda K (1979). Detection of rotavirus from faeces by reversed passive haemagglutination method, *J Clin Pathol* 32: 963.
  - 5) Wilson MB, Nakane PK (1978). In knapp W, Holuber K, Wick G (ed). Immunofluorescence and related staining techniques, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, p. 215-224.
  - 6) Bishop RF, Davidson GP, Holmes IH, ruck BJ (1984). Detection of a new virus by electron microscopy of fecal extracts from children with acute gastroenteritis, *Lancet* 1 : 149-151.
  - 7) Sato K, Inada Y, Shinozaki T, Fijii R, Matsumoto M (1981). Isolation of human rotavirus in cell cultures, *Arch Virol* 69 : 155-160.
  - 8) Yolken RH, Kim HW, Clem T, Wyatt RG, Kalica AR, Chanock RM, Kapikian AZ (1977). Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of human reovirus-like agent of infantile gastroenteritis, *Lancet* 2 : 263-266.
  - 9) Saif LF, Bohl EH, Theil KW, Cross RF, House JA (1980). Rotavirus-like, calicivirus-like, and 23-nm virus-like particles associated with diarrhea in young pigs, *J Clin Microbiol* 12 : 105-111.
  - 10) McNulty MS, Allan GM, Toda D, McFerran JB, Mccracken RM (1981). Isolation from chickens of a rotavirus lacking the rotavirus group antigen, *J Gen Virol* 55 : 405-413.
  - 11) Bridger JC, Clarke IN, McCrae MA (1982). Characterization of an antigenically distinct porcine rotavirus, *Infect Immun* 35 : 1058-1062.
  - 12) Tao H, Guongmu C, Changan W, Zingyi C, Tungxin C, Weiwei Y, Henli Y, Kinghai M (1983). Rotavirus-like agent in adult non-bacterial diarrhea in China, *Lancet* 2 : 1078-1079.
  - 13) 大瀬戸光明, 山下育孝, 奥山正明, 桑原広子, 井上博雄, 石丸啓郎 (1986). ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による非定型ロタウイルスの検出, *医学のあゆみ* 136 : 223-224.
  - 14) 田島剛, 木村貞夫, 牛島廣治, 金保深, 荒木和子, 篠崎立彦, 藤井良知 (1983). Rotavirus およびその抗原の検出成績の比較: PAGE, LA, および ELISA, *臨床とウイルス* 11 : 408-409.
  - 15) 田島剛, 木村貞夫, 金保深, 牛島廣治, 荒木和子, 篠崎立彦, 藤井良知 (1984). 各種の方法によるヒトロタウイルスの検出成績, *臨床とウイルス* 12 : 322-324.
  - 16) 勝島矩子, 矢崎資, 坂本美千代, 五十嵐直子, 加藤幸之助, 鈴木宏 (1983). 糞便中ヒトロタウイルス検出法の比較——電子顕微鏡, 免疫酵素法, 逆受身赤血球凝集反応, ラテックス凝集反応について——, *臨床とウイルス* 11 : 247-251.
  - 17) 田沢三代, 鈴木宏, 今井明, 沓沢とよ子, 今野多助, 坂本美千代, 矢崎資, 藤山純一, 中川美智子, 勝島矩子 (1981). ELISAによるヒトロタウイルスの検出. *医学のあゆみ* 117 : 881-885.
  - 18) 白地良一, 梅津幸司, 白石広行, 今野二郎 (1981). RPHA法によるロタウイルス抗体の検出, *臨床とウイルス* 9 : 353-356.
  - 19) Mutsuno S, Inouye S, Hasegawa A, Kono R (1982). Assay of human rotavirus antibody by immune adherence hemagglutination with a cultivable human rotavirus as antigen, *J Clin Microbiol* 15 : 163-165.
  - 20) Yolken RH, Wyatt RG, Zisis G, Brandt CD, Rodriguez WJ, Kim HW, Urrutia JJ, Mata L, Greenberg HB, Kapikian AZ, Chanock RM (1978). Epidemiology of human rotavirus type 1 and 2 as studied by enzyme-linked immunosorbent assay, *N Engl J Med* 23 : 1156-1161.
  - 21) 井上栄 (1981). IAHA試験法の特長, *臨床とウイルス* 9 : 53-56.
  - 22) 曲泰弘, 田中智之, 伊藤端子, 出口雅経, 小池通夫, 宮本博行 (1981). ELISA法による糞便中ヒトロタウイルスの検出および血中抗体価の測定. *臨床とウイルス* 9 : 211-217.
  - 23) 山西重機 (1984). 香川県下におけるウイルス性下痢症とその疫学, *感染症学雑誌* 58 : 774-783.